

**DIE BIOLOGISCHE REAKTION
AUF DEN
KNOCHENERSATZWERKSTOFF
HYDROXYLAPATIT-KERAMIK**

Frank B. Bagambisa

Aus der Klinik und Poliklinik für Kieferchirurgie
der Universität München

Direktor: Professor Dr. Dr. D. Schlegel

DIE BIOLOGISCHE REAKTION
AUF DEN KNOCHENERSATZWERKSTOFF
HYDROXYLAPATIT-KERAMIK

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Frank B. Bagambisa
aus
Kabale/Uganda

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. E. Dielert
Mitberichterstatter: Professor Dr. Dr. D. Schlegel
Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 1986

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1 Einleitung	1
2 Kritische Literaturübersicht	3
2.1 Einteilung der in der Medizin bisher angewandten Keramischen Werkstoffe	4
2.2 Mechanische Festigkeitsprobleme der Keramischen Werkstoffe	5
2.3 Oberflächenreaktive Keramische Werkstoffe	7
2.3.1 Biogläser und Glaskeramiken	7
2.3.2 Calciumphosphate	8
2.4 Hydroxylapatit-Keramik	9
2.4.1 Chemie	10
2.4.2 Verarbeitung	11
2.4.3 Oberflächeneigenschaften	17
2.4.4 Bioaktivität des Hydroxylapatits	19
2.5 Knochenaufbau und -entstehung	22
2.5.1 Primäre Knochenentstehung	30
2.5.2 Postnatale Knochenentstehung	32
2.5.3 Fraktur- und Osteotomieheilung	33
2.5.4 Lokale Faktoren und Mechanismen der Knochen- induktion	36
2.5.5 Theorien der Apatitfällung	38
3 Eigene Untersuchungen	41
3.1 Morphologische Eigenschaften und chemische Zusammensetzung des Implantatwerkstoffes	42
3.1.1 Rasterelektronenmikroskopie am Ausgangspulver	42
3.1.1.1 Geräte	42
3.1.1.2 Befunde	43
3.1.2 Rasterelektronenmikroskopie an den Sinterpro- dukten	44
3.1.2.1 Geräte	45
3.1.2.2 Befunde	45
3.1.3 Röntgendiffraktometrische Untersuchungen am Implantatmaterial	50
3.1.3.1 Gerät	50
3.1.3.2 Befunde	51

3.2	Tierversuche	53
3.2.1	Formgebung der Implantate und vorbereitende Maßnahmen zur Inkorporation	53
3.2.2	Versuchstiere	53
3.2.3	Präparatgewinnung	55
3.3	Lichtmikroskopie	56
3.3.1	Präparationsmethodik	58
3.3.2	Geräte	58
3.3.3	Befunde	59
3.4	Rasterelektronenmikroskopie	68
3.4.1	Präparationsmethodik	69
3.4.2	Geräte	74
3.4.3	Befunde	74
3.5	Korrosionsversuche	125
3.5.1	Präparationsmethodik	125
3.5.2	Medium	125
3.5.3	Versuchsanordnung	126
3.5.4	Rasterelektronenmikroskopie	127
3.5.5	Befunde	127
3.5.6	Spurenanalytik	129
4	Kritik und Auswertung der Ergebnisse	131
4.1	Charakteristik des Ausgangsmaterials und des Implantatwerkstoffes	131
4.2	Lichtmikroskopie	134
4.3	Rasterelektronenmikroskopie	136
4.4	Korrosionsversuche	152
5	Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen	155
6	Zusammenfassung	160
	Literaturverzeichnis	162

1 Einleitung

Präprothetisch chirurgische Eingriffe stellen einen wesentlichen Bestandteil des Operationsgutes Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgischer Kliniken dar. Sie werden erforderlich, wenn es dem Zahnarzt infolge weitgehender Atrophie der Kiefer nicht mehr gelingt, einen ausreichend festsitzenden und funktionstüchtigen Zahnersatz einzugliedern.

Bei den chirurgischen Maßnahmen unterscheiden wir relative Erhöhungen des Alveolarkammes - Vertiefung des Mundvorhofes und des Mundbodens durch Weichteilverlagerung - und absolute Erhöhungen. Letztere werden erforderlich, wenn die Kammatrophy so fortgeschritten ist, daß durch ausschließliche Weichteilverlagerung nicht mehr genügend Retentionsmöglichkeiten für die Prothese geschaffen werden können. In solchen Fällen muß der verlorengegangene Alveolarknochen durch autologes, homologes oder allogen Material ersetzt werden.

Während den relativen Erhöhungen bei entsprechender Operationstechnik eine gute Erfolgsquote zugestanden wird, ist die Diskussion um die Indikation zur absoluten Erhöhung der Alveolarkämme im Ober- und Unterkiefer bis heute nicht abgeschlossen. Dies kommt auch in der jüngsten größeren statistischen Erhebung von Kerschbaum(1982) zum Ausdruck. Der Umfrage waren 22 universitäre und 5 nicht universitäre Chirurgische Kliniken und 20 Prothetische Hochschulabteilungen angeschlossen. Fast zwei Drittel der Prothetiker und 40% der Kieferchirurgen sahen keine Indikation zur absoluten Erhöhung des Alveolarkammes im Oberkiefer. Der analoge Eingriff im Unterkiefer wurde von 20% der Chirurgen und der Hälfte der Prothetiker generell abgelehnt.

Die Zahlen demonstrieren eindringlich die geringe Erfolgsquote, welche dem präprothetisch-chirurgischen Eingriff zugestanden wird und die große Zurückhaltung gegenüber dem bisher üblichen auto- und homologen Aufbaumaterial. Auch die Erfahrungen der Münchener Klinik mit dieser restaurativen Alveolarkammplastik sind nicht ungetrübt. Transplantiert er Knorpel erwies sich als formbeständiger, aber infektanfälliger. Autologer Knochen heilte besser ein, neigt jedoch zu z.T. erheblicher Resorption. So wurden Trans-

plantathöhenverluste bis zu 50 % im ersten und fast 90 % im dritten Jahr bei Rippen- und Beckenspänen beobachtet.

Als weitere Komplikationen nach Transplantationen, aber auch beim Einbringen von Cialit-konserviertem Stützgewebe - insbesondere Knorpel - sind Wundheilungsstörungen, partielle, ja sogar totale Verluste des Aufbaumaterials sowie trophische Störungen zu nennen. Hinzu kommen wiederholt notwendige Korrektur Eingriffe am Zahnersatz in Form von Druckstellenentfernungen und Unterfütterungen, die vom Patienten und Zahnarzt viel Geduld erfordern.

Diese geschilderte Problematik resultiert zum großen Teil aus dem ersatzschwachen Lagergewebe. Die nutritive Versorgung des eingebrachten Stützgewebes erfolgt ausschließlich über das Periost zunächst durch Diffusion, später durch terminale Strombahnsprossung.

Nichtbeeinflussbarkeit des ersatzschwachen Lagergewebes, der Histokompatibilität und kaum mehr zu verbessernde Operationstechniken veranlaßten die Chirurgen nach geeigneten Knochenersatzwerkstoffen für die Alloplastik Ausschau zu halten. Ermutigende Entwicklungen zeichnen sich bei keramischen Materialien ab. Dem beabsichtigten Einsatz entsprechend, gilt in der Kieferchirurgie das besondere Interesse der Calciumphosphatkeramik. Calciumphosphate sind Hauptbestandteil der anorganischen Komponente natürlicher Stützgewebe. So soll reine Apatitkeramik unmittelbar mit dem Lagergewebe reagieren. Bei Implantaten aus gesinterten Calciumphosphaten soll dies nach bisherigem Kenntnisstand durch Ionenaustausch und Hydrolyse möglich sein. Auf diesem Wege könnten aus der Oberfläche freigesetzte Calcium- und Phosphationen die Einheilung der Hydroxylapatitkeramik fördern. Im Zuge der restaurativen Alveolarkamoplastik und bei konturverbessernden Operationen im Gesichtsbereich ist dabei ein Knochenverbund wünschenswert. Das bisherige Wissen über keramische Werkstoffe, deren Verhalten in vitro und in vivo sowie mögliche Wechselwirkungen mit dem natürlichen Knochen sei im Folgenden anhand der Literatur zusammengestellt.

2 Kritische Literaturübersicht

Unter keramischen Werkstoffen versteht man im allgemeinen Sprachgebrauch die herkömmlichen kieselsäurehaltigen Tonwaren. In der Medizin gilt diese Bezeichnung im allgemeinen für Festkörper, die aus handelsüblichen pulverförmigen Oxiden oder Oxidverbindungen hoher Reinheit nach keramischen, ggf. pulvermetallurgischen Methoden hergestellt werden. Dabei handelt es sich um die sog. Oxid- und Glaskeramiken. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften und des chemischen Verhaltens werden durch spezielle Wärmebehandlung hergestellte Festkörper aus elementarem Kohlenstoff den keramischen Werkstoffen hinzugerechnet.

In breiterem Umfang haben bisher

1. Aluminiumoxid-Keramiken,
 2. Calciumoxid-Keramiken,
 3. Glas-Keramiken und die Biogläser
- in die Medizin Einzug gehalten.

- 1) Aluminiumoxid-Keramik (Al_2O_3) findet bereits in größerem Umfang für den Hüftgelenkspfannenersatz (GRISS et al. 1976, 1977), für Hüftgelenkstotalendoprothesen (BOUTIN 1974), als Beschichtungsmaterial für künstliche Gelenke und für Kiefergelenksendoprothesen (FRENKEL u. NIEDERDELLMANN 1975, NIEDERDELLMANN et al. 1976, MOMMA 1977, 1978) Anwendung. Eingesetzt wird Al_2O_3 -Keramik auch bei der Fertigung von Abstandshaltern zur Wirbelsäulen-Orthopädischen Behandlung. Im Zuge der präprothetischen Chirurgie ist Al_2O_3 bei der Kammerhöhung der Kiefer implantiert worden (PEDERSEN 1976).
- 2) Calciumoxid-Keramiken sind als Ersatz für das innere Ohr (GROTE et al. 1981), bei der Orbitadach- und -bodenrekonstruktion (ALLARD u. SWART 1982), bei Z-Osteotomien im aufsteigenden Kieferast (SWART u. DE GROOT 1980, TUINZING u. SWART 1981) und bei der Immobilisierung von Wirbelkörpern verwandt worden (SWART et al. 1979, FEENSTRA u. DE GROOT 1983).
- 3) Glaskeramik und Bioglas finden bei der Kieferkammerhöhung (BUNTE u. STRUNZ 1977) und der Innenohr-Chirurgie Anwendung.

Experimentell für Implantationszwecke sind jedoch inzwischen eine Vielzahl keramischer Werkstoffe erprobt worden. Dies sind vor al-

lem CaOAl_2O_3 , CaO.TiO_2 , CaO.ZrO_2 (HULBERT et al. 1970, 1972, GRAVES et al. 1971), $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-MgO}$ (GRISS et al. 1973), Al_2O_3 (GRISS et al. 1974), Siliciumnitrid (GRISS et al. 1980). HULBERT et al. (1973) weisen auf insgesamt 38 verschiedene für Implantationszwecke in Frage kommende Keramische Werkstoffe hin.

2.1 Einteilung der in der Medizin bisher angewandten Keramischen Werkstoffe

Dem Mikroaufbau nach sind Keramische Werkstoffe zumeist kristalline Substanzen, wie Al_2O_3 , Calciumphosphat-Keramiken, manche Biogläser und Glaskeramiken sowie die aus Kohlenstoff bestehenden Hartgewebeersatz-Materialien. HENCH u. ETHRIDGE (1975) teilten die keramischen Werkstoffe nach ihrem chemischen Verhalten im Implantatlager in 3 Gruppen ein:

- 1) die vollständig resorbierbaren,
- 2) die oberflächenaktiven,
- 3) die beinahe inerten.

Nach ihren Anhaftungsmechanismen zum knöchernen Lagergewebe ordneten sie (1982a) diese Werkstoffe in 4 Arten ein:

- 1) Dichte, nicht poröse inerte Keramiken, bei denen das Anhaften am Knochen durch Oberflächenunebenheiten (z. B. Gewinde, Rillen), Zementieren, ggf. durch Unter-Druck-Einsetzen erzielt wird.
- 2) Poröse inerte Werkstoffe, bei denen ein Knocheneinwachsen das mechanische Anhaften gewährleistet.
- 3) Dichte, nicht poröse oberflächenreaktive Keramische Werkstoffe (Gläser, Glaskeramiken), bei denen eine "chemische Verbindung" zum Anhaften am Knochen führt.
- 4) Dichte, nicht poröse (oder auch poröse) resorbierbare Keramische Werkstoffe, deren Ersatz durch neugebildeten Knochen das Endziel des Konzeptes darstellt.

Nach Porengröße und Porenverteilung können die Keramischen Werkstoffe wiederum in 4 Gruppen unterteilt werden.

- 1) Dicht gesinterte (nahezu porenfrei)
- 2) Mikroporöse (nur Mikroporen $\varnothing < 100 \mu\text{m}$)
- 3) Makro- Mikroporöse (Makroporen und Mikroporen)
- 4) Makroporöse (nur Makroporen $\varnothing > 100 \mu\text{m}$)

Die Porengröße und deren Verteilung ist beim Herstellungsprozeß Keramischer Werkstoffe je nach beabsichtigtem Einsatz steuerbar und reproduzierbar. Fernerhin können die Poren interkonnektierend oder nicht durchströmbar sein.

2.2 Mechanische Festigkeitsprobleme der Keramischen Werkstoffe

Das Keramikgefüge ist mit der Unfähigkeit behaftet, sich einer plastischen Deformation zu unterziehen. Daraus resultiert das für Keramische Werkstoffe kennzeichnende Belastungs-Dehnungs-Verhalten (Abb. 1).

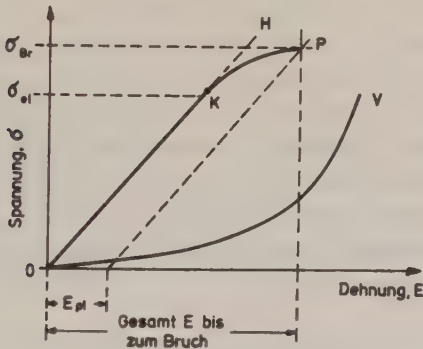


Abb. 1

Spannungs-Dehnungs-Diagramm (in Anlehnung an HENNICKE et al. 1977)

OH - Verhalten eines perfekt elastischen (Hooke'schen) Materials

OP - Bruch mit plastischer Dehnung E_{pl}

OK - Bruch ohne plastische Verformung (Sprödbbruch)

OV - Verhalten eines viskoelastischen Materials (z. B. Knochen)

E_{pl} - plastische Verformung

σ_{Br} - Bruchfestigkeit

σ_{el} - Elastizitätsgrenze

Das mechanische Verhalten Keramischer Werkstoffe - unter zunehmender Spannung direkt vom elastischen Verformungsbereich $0-\sigma_{el}$ zum Bruch K überzugehen, ohne daß eine plastische Verformung E_{pl} eingetreten wäre - läßt bereits die Problematik ihres Einsatzes als Implantatmaterial erkennen.

- 1) Einer lokalen mechanischen Belastung (Stoß) können sie nicht widerstehen, da sie zu spröde sind.
- 2) Im Gegensatz zu Metallen sind sie keine duktilen Werkstoffe.
- 3) Eine Verbesserung der Festigkeitseigenschaften ist nur über ein ausgeglicheneres Verhältnis von Zug- und Biegefestigkeit, des Elastizitätsmoduls und der Bruchdehnung zu erreichen. Bei den heutigen Keramischen Werkstoffen erreicht die Bruchdehnung jedoch keinen positiven Wert, während Elastizitätsmodul und Zugfestigkeit günstiger liegen.

Einen entscheidenden Einfluß auf das Festigkeitsverhalten Keramischer Werkstoffe hat der Gefügebau. Dies sowohl im Hinblick auf Größe und Anordnung der Kristallphase (Korngröße und -Verteilung) als auch in Bezug auf Anteil und Verteilung der Glasphase an den Korngrenzen. Von Bedeutung sind fernerhin die Gesamtporosität (Größe und Verteilung) und der Umstand, ob die Poren interkonnektierend oder nicht durchströmbar sind. Die Gefügeanalyse bei Keramischen Werkstoffen hat deshalb neben der Feststoffanalyse die Porenanalyse mit einzubeziehen. Die Festigkeitskennzahlen der für medizinische Anwendungen relevanten Keramischen Werkstoffe sind in Tab. 1 aufgetragen.

	Druckfestigkeit MN m ⁻²	Biegefestigkeit MN m ⁻²	Härte GN m ⁻²	Elastizitätsmodul GN m ⁻²	Dichte g cm ³
Al ₂ O ₃	3000-4000	400	22-23	350-380	3,9
Al ₂ O ₃ ^a	5000	500		380	
Glas Keramik	500	100-150	10	35	2,8
TCP Keramik	100-600	100-150	4,7	33	3,0-3,1
HA Keramik	350-450	40-120	4,2-4,5	35-120	2,9-3,1
Kohlenstoff		130-520		25-28	
natürl. Knochen	40-160	300		14-21	1,7-2,0

Tab. 1

Typische Festigkeitskennzahlen für Keramische Werkstoffe

a = Kennzahlen für 99,7 % Al₂O₃ mit 4µm Korngröße

Mittelwerte und Standardabweichungen der Festigkeitskennzahlen sind bei Keramischen Werkstoffen jedoch wegen ihrer Anfälligkeit für Oberflächenrisse nicht einheitlich (JARCHO et al. 1976). Ihre Biegefestigkeiten erreichen im Gegensatz z. B. zu Metallen nur 1/3 bis 1/10 der Druckfestigkeit (HENNICKE et al. 1977).

2.3 Oberflächenreaktive Keramische Werkstoffe

Zu der oberflächenreaktiven Gruppe gehören Biogläser und Glaskeramiken sowie die Calciumphosphat-Keramik-Werkstoffe. Das Besondere bei deren Implantation ist nicht nur in der Tatsache begründet, daß sie von Lagergewebe verschiedenster Art ausgezeichnet toleriert werden, sondern im Falle des Hartgewebeersatzes sogar an den lokalen Knochenumbauvorgängen teilnehmen. Diese Aktivität führt bis zu einem Verbund. Dieser festen, vermutlich biochemischen Knochen-Implantat-Verbindung dürfte ein physikalisch-chemisches Zusammenspiel zwischen Knochenbett und Implantat zugrundeliegen (HENCH u. PASCHALL 1973, 1974; BECKHAM et al. 1971). Dadurch erübrigt sich die Notwendigkeit, die Dauerverankerung des Implantats über Schrauben oder andere mechanische Retentionen herbeizuführen.

2.3.1 Biogläser und Glaskeramiken

HENCH et al. (1971) entwickelten reaktive Gläser und deren polykristalline Analoge - die Glaskeramiken -, Diese scheiden in Lösung die inkorporierten $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ -Bestandteile als Calciumphosphate an die Implantatoberfläche aus (HENCH u. PASCHALL 1973, BLENCKE et al. 1974, 1977, 1978). Dadurch soll die Knochenauflagerung positiv beeinflusst werden. Grad und Geschwindigkeit der Reaktivität lassen sich durch das Variieren des SiO_2 -, P_2O_5 -, CaO -, Na_2O -, B_2O_3 -, CaF_2 -, MgO -, Al_2O_3 -, TiO_2 -, Ta_2O_5 -Gehaltes beeinflussen. Dementsprechend rufen die Keramiken verschiedene Reaktionen im Körpermilieu hervor (HENCH u. ETHRIDGE 1982 d, CLARK et al. 1976).

2.3.2 Calciumphosphate

Calciumphosphate zeichnen sich durch die Tendenz aus, Serienverbindungen einzugehen. Dieses Merkmal schafft fließende Grenzen und chemische Vielfältigkeit (Tab. 2).

ZUSAMMENSETZUNG	ABKÜRZUNG	MINERALANALOG	FORMEL	IDEALISIERTES CA/P - VERHÄLTNIS	
Dicalcium phosphoricum	(DCP)	Monetit	Ca HPO_4	1,0	thermo- dynamische Stabilität
Dicalcium phosphoricum dihydrat	(DCPD)	Brushit	$\text{Ca HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0	
Octacalciumphosphat	(OCP)	-	$\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	
Amorphes Calciumphosphat (Tricalciumphosphathydrat)	(ACP)	Whitlockit	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4, \text{PO}_4)_6$	variabel (1,33 - 1,5)	
Magnesiumhaltiges Whitlockit	(MgWh)	Magnesium-Whitlockit	$\text{Ca}_9\text{Mg}(\text{HPO}_4, \text{PO}_4)_6$	1,5	
Tetracalciumphosphat	-	-	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	2,0	Solubilität bei physiol pH-Werten
Tricalciumphosphat	(TCP)	«ß-Whitlockit»	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	
Apatite:					
Defekt-Hydroxylapatit	(DOHA)	-	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)\text{OH}$	1,5	
Pentacalciumtriphosphat	(OHA)	Hydroxylapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	
Pentacalciumfluorophosphat	(FA)	Fluorapatit, Frankolit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1,67	
CO_3^{2-} -haltiger Apatit	($\text{CO}_3\text{-A}$)	Dahlit	$(\text{Ca, Na})_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6$	1,67 - 2,0	

Tab. 2

Im Knochen nachgewiesene bzw. bei der Knochenverkalkung vermutlich beteiligte Calciumphosphatverbindungen, ausgenommen $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$

Dieses chemische Verhalten im allgemeinen und die daraus resultierenden vielfachen strukturellen und chemischen Einflußmöglichkeiten auf das Apatitgitter führen immer wieder zu unterschiedlichen Deutungen der in vitro und in vivo Phänomene bei Calciumphosphaten. Je nach Dar- bzw. Herstellungsmethode und -bedingungen unterscheiden sich die "gleichen" Calciumphosphatverbindungen. ARNOLD (1950) hebt hervor, daß es in der Praxis sehr unwahrscheinlich sei, daß zwei Produkte mit Molarverhältnissen Ca/P zwischen 1,33 (Octacalciumphosphat) und 1,67 (Hydroxylapatit) je identisch sind.

Daraus resultieren Begriffe wie z. B. "Mischkristalle, hydroxylapatitähnlich, mit dem HA übereinstimmend, Ca/P-Verhältnis zwischen x und y". Ähnliche auf die schwere Bestimmbarkeit hindeutende Aus-

drücke tauchen in der Literatur über HA immer wieder auf. Die schwere Definierbarkeit resultiert nicht nur aus dem breiten Spektrum der möglichen Herstellungs- und Reaktionsmöglichkeiten, sondern auch aus der starken Neigung von Calciumphosphaten, uneinheitliche Fällungsprodukte zu bilden. Diese Tendenz läßt sich vor allem auf das verbreitete Vorliegen von Begleitcalciummonohydrogenphosphat (Monetit, CaHPO_4) und dessen Hydratform (Brushit, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in Calciumphosphat-Lösungen zurückführen.

Diese Unpräzisierung kann sich von den Ausgangsstoffen über den Herstellungsprozeß bis zum fertigen Implantatwerkstoff erstrecken. Die daraus resultierenden uneinheitlichen chemischen und mechanischen Eigenschaften lassen verschiedene biologische Wirkungen und Reaktionen erwarten. Dementsprechend erstreckt sich auch die nicht einheitliche oft irreführende Nomenklatur von den Handelsproduktionen bis in die Fachliteratur. So wird ein zur Analyse (Reagent grade) benötigtes Präparat gleichzeitig als Pentacalciumphosphat, Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat (ROOTARE u. CRAIG 1978, ROOTARE et al. 1978, PEELEN et al. 1977, 1978, DENISSEN et al. 1980a) bezeichnet. Die Niedrigtemperatur-Modifikation von Tricalciumphosphat (TCP)- β -TCP- verhält sich nur unter strengen Herstellungsbedingungen ($\text{Ca/P-Molarverhältnis: } 1,48 \pm 0,01$) wie das Mineral Whitlockit. Ferner hängt die Umwandlungstemperatur $\alpha\text{-TCP} \rightleftharpoons \beta\text{-TCP}$ stark von dem Partialdruck des Wasserdampfes ab (DRIESSENS 1983; BREDIG et al. 1933). Deshalb wird das Mineral Whitlockit kaum mit dem synthetischen β -TCP gleichzusetzen sein. In Handel und Fachliteratur werden die synthetischen Hochtemperatur-Produkte (Sinter-Produkte) von TCP und das Mineral Whitlockit jedoch z. T. synonym gebraucht.

2.4 Hydroxylapatit-Keramik

Es gibt zahlreiche Methoden zur Herstellung von Calciumhydroxylapatit. Bis heute fehlt jedoch eine genau definierte festgelegte (z. B. DIN-Normen) Herstellungsmethode, wonach ein bestimmtes Apatit mit vorhersagbarer Zusammensetzung und reproduzierbarem Oberflächenverhalten erzeugt werden kann.

Die herkömmlichen 3 Verfahren zur Herstellung von Keramischen Werkstoffen aus Calciumhydroxylapatit ergeben Erzeugnisse mit

schwankenden Inklusionen von β -TCP und Oxyapatit - $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}^{--})$. Dies ist bedingt durch schwer zu beeinflussende und wenig kontrollierbare Fällungsreaktionen sowie nicht einheitliche Temperaturen und Zeiten beim Sintern.

Werden solche Erzeugnisse als Implantatwerkstoff verwandt, so werden sie unterschiedliche biomechanische Eigenschaften aufweisen und zudem unterschiedliche biologische Reaktionen hervorrufen. Vielleicht lassen sich hierdurch die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen erklären. Wünschenswert wären einheitliche internationale Normen bezüglich Reinheit der Ausgangsstoffe und genau festgelegte Herstellungsverfahren für Implantate.

2.4.1 Chemie

Hydroxylapatit gehört zu den Apatit-Gesteinen mit der Allgemein-formel $\text{M}_5(\text{YO}_4)_3\text{X}$. Hierbei stellen M ein zweiwertiges Metall-Ion - wie Ca^{++} oder Sr^{++} -, Y ein dreiwertiges Atom - normalerweise P und selten As - dar. X ist ein einwertiges Anion - wie OH^- oder F^- . Hydroxylapatit ist Pentacalciumtriphosphat $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ bzw. $\text{Ca}_{10}\text{P}_6(\text{OH})_2]$. Wenn das PO_4 -Radikal bzw. das einwertige Anion (F^- , OH^-) durch CO_3^{--} ersetzt wird, entsteht Carbonatapatit (Tab. 2), der anorganische Hauptbestandteil von Knochen und Zähnen.

Das Ca/P-Molarverhältnis der synthetisch hergestellten Apatite nähert sich besser der idealen chemischen Apatit-Stöchiometrie von 1,67 als die in vivo gefällten Apatite. Diese sind calciumärmer, wenngleich sie örtlich ein Ca/P-Molarverhältnis größer als 2,0 aufweisen können. Daraus resultieren Bezeichnungen wie Defekt-Hydroxylapatit (DHA) oder "poorly crystalline hydroxyapatite" (PCHA).

Frisch bei gewöhnlichen Temperaturen gefällter und bei 110°C getrockneter Hydroxylapatit hat eine Kristallitgröße von etwa $0,01\ \mu$ (GMELIN 1961). Daraus ergibt sich eine spezifische Oberfläche von $200\ \text{m}^2/\text{g}$ (GMELIN 1961). Da die Ionenradien von F^- und OH^- nahezu gleich sind, stimmt die Gitterstruktur (hexagonal) des HA mit dem Fluorapatit überein (HENDRICKS et al. 1932). Die Kantenlängen der hexagonalen Elementarzelle ($a = b = c$) betragen $a = 9,42$ und $c = 6,88\ \text{\AA}$, die Kantenwinkel $\alpha = \beta = 90^\circ$ und $\gamma = 120^\circ$.

2.4.2 Verarbeitung

Zu keramischen Implantat-Werkstoffen führen grundsätzlich 3 Herstellungsmethoden.

- a) Reaktionen im festen Zustand
 - b) Hydrothermale Methoden
 - c) Fällungsverfahren
- a) Ein Gemisch von Tri- und Tetracalciumphosphat ($\text{CaO-P}_2\text{O}_5$) mit 56,8 Gew.% CaO wird erhitzt. Die Schmelze erstarrt in feuchter Luft bei $1050^\circ - 1100^\circ \text{C}$ nach der Reaktionsformel $2 \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ zu HA. Ein anderer Weg zum Hydroxylapatit führt über das Erhitzen von Fluorapatit, das bei Temperaturen zwischen $1300^\circ - 1400^\circ \text{C}$ unter Wasserdampfzusatz in HA übergeht.

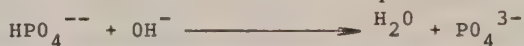
- b) Die hydrothermalen Techniken nutzen die Tatsache, daß Calciumphosphatverbindungen - Calciummonohydrogenphosphat (CaHPO_4), Octacalciumphosphat ($\text{Ca}_8\text{H}(\text{PO}_4)_3$ bzw. $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$), Calciumpyrophosphat ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) - in schwachsaurer, neutraler oder basischer Lösung in HA übergehen. PERLOFF u. POSNER (1960) gelang es, in einem geschlossenen System CaHPO_4 zu HA zu hydrolysieren:



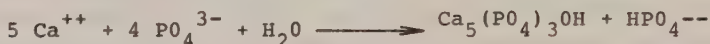
Neuerdings stellten RAO u. BOEHM (1974) auf hydrothermalem Wege aus CaCO_3 Hydroxylapatit-, Fluorapatit- und Chloroapatit-Implantatwerkstoffe her. Auf ähnlicher chemischer Grundlage entstehen die sogenannten "replamineform implants" (CHIROFF et al. 1975, ROY u. LINNEHAN 1977, SALYER et al. 1977, FINN et al. 1980). Hierbei handelt es sich um die Umsetzung des Korallen- CaCO_3 -Skeletts bestimmter Meerestiere in einen Calciumphosphatkeramikwerkstoff unter Erhaltung der biologisch geschaffenen porösen Struktur. Der Vorteil liegt darin, daß Porenanordnung und -verteilung hierdurch regelmäßiger sind und nicht den Zufälligkeiten üblicher Fertigungsverfahren (H_2O_2 -Einleitung, lost Wax-Technik) überlassen bleibt. Die Antwort auf die Frage, ob diese Überlegenheit im Porendesign auch mit besseren Bioeigenschaften einhergeht, bedarf weiterer Abklärung.

c) Bei den Fällungsverfahren (Naß-Verfahren) wird HA unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen aus Ca- und PO_4 -Lösungen gefällt (HAJEK u. NEWSELY 1963, NEWSELY 1966) und ggf. gezüchtet. Die Gewinnung von chemisch reinem HA ist bei den üblichen Fällungsverfahren insofern schwer, weil sich Octacalciumphosphat ($\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ bzw. $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) begleitend niederschlägt. Octacalciumphosphat (OCP) hat Apatitstruktur und wandelt sich beim Calcinieren (Brennen) in β -TCP um. Bei diesem Verfahren muß streng darauf geachtet werden, daß

1. der pH-Wert bis auf 12 gebracht wird, damit so die Konzentration der sich anderenfalls ständig bildenden HPO_4^{--} -Ionen gegenüber den PO_4^{3-} -Ionen vernachlässigbar niedrig gehalten werden kann. Dies verhindert die Bildung von Begleitmonohydrogenphosphat (Monetit, CaHPO_4) durch



und erlaubt den ungestörten Verlauf der Hauptreaktionen zu HA als Endprodukt:



2. Mutterlauge und Calciumsalz so gewählt sind, daß entstehende Nebenprodukte leicht entfernbar sind. Das geschieht z. B. beim Glühen, wenn das Calciumsalz als Nitrat und Phosphat sowie Hydroxid als Ammoniumsalze vorliegen.



3. Die Phosphatlösung zur Calciumlösung hinzugetropft wird, damit die Phosphatkonzentration in der Mutterlauge möglichst niedrig gehalten werden kann. So wird vermieden, daß Absorptionsreaktionen von Phosphat mit der Festkörperoberfläche des Bodensatzes auftreten. Im anderen Fall wäre das unerwünschte Brushit der Endstoff (NEWSELY 1966, TAGAI u. AOKI 1980).

HA läßt sich auch nach einem anderen Fällungsverfahren herstellen. Hierbei werden Calciumhydroxid- und Phosphatlösungen bis zum "Apatitpunkt" titriert (TAGAI u. AOKI 1980).

Die nach dem Fällungsverfahren gewonnenen Pulver werden nun vor dem

Sinterungsprozeß in die definitive Implantatform gebracht bzw. als Werkstückblock zur individuellen Gestaltung eines Implantates gefertigt. Als Verfahren dienen der Preß- und Schlickerguß. Neben dem Kaltpressen kommt das simultane Erhitzen und Pressen (continuous hot pressing) zur Anwendung.

Kaltes Pressen bewirkt ein Zusammentreten der Partikel durch Kohäsionskräfte, eine Verminderung der Gesamtoberfläche und eine Dichtezunahme. Dadurch wird die Koordinationszahl erhöht und eine gewisse mechanische Festigkeit erreicht (ROOTARE u. CRAIG 1978). Die Zunahme der Koordinationszahl gibt dem Grünkörper bessere Voraussetzungen zum Sintern. Auch wenn die Verdichtung von Pulvern durch Isoaxial-Pressen (uniaxial pressing) erfolgen kann (KRAJEWSKI u. RAVAGLIOLI 1981), so sind doch die dadurch erreichbaren Druckeffekte wie die Designmöglichkeit bezüglich der Form begrenzt (JARCHO 1981).

Aufgrund dessen wird das "Isostatisch-Pressen" angewandt, um homogen verdichtete Grünkörper (Preßling) und festere Calciumphosphat-Sinterprodukte zu erhalten (RAO u. BOEHM 1974, ROOTARE et al. 1978, NEWSELY u. OSBORN 1980). In der Literatur über erprobte Calciumphosphatkeramik für Implantationszwecke werden beim Pressen angewandte Druckwerte von ca. 500 psi (3,4 Mpa) - bei ROOTARE u. CRAIG (1978) - bis 414 MPa (ROOTARE et al. 1978) angegeben.

Beim Sintern nimmt anfänglich die Dichte exponentiell - je nach Höhe des vorgegebenen Preßdrucks - zu, und erreicht dann je nach Partikelgestalt und -größe (OKAZAKI et al. 1980) einen konstanten Wert. Nach ROOTARE u. CRAIG (1978) beginnt der Anteil geschlossener Poren schon bei 750 psi (5,2 MPa) sich auf Kosten der offenen zu vermehren. Eine weitere Erhöhung des Preßdrucks nach dem Erreichen der konstanten Gesamtdichte - von diesen Autoren bei 500 psi (34,5 MPa) angegeben - erhöht zwar die Härte (OKAZAKI et al. 1980), beeinflusst jedoch die Gesamtdichte bzw. -porosität wenig, da die Verdichtung jetzt hauptsächlich durch Umsetzung der offenen Poren in geschlossene erfolgt.

Bei den Grünkörpern (Preßlinge), die Verdichtungskräfte oberhalb dieses kritischen Wertes erfahren haben, läßt sich eine Herabsetzung der Gesamtdichte des gesinterten Produktes feststellen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Luft in den geschlossenen Poren sich anlässlich des Sinterns ausdehnt, wobei die Gesamtdichte

sinkt. Damit sind der sinnvollen Erhöhung des Preßdrucks Grenzen gesetzt, ausgenommen der Verdichtungsprozeß findet unter Vakuumbedingungen statt (ROOTARE u. CRAIG 1978).

Bei gleichzeitigem Erhitzen und "Isostatisch-Pressen" (continuous hot-pressing) gelingt es, Grünkörper und Keramik in einem Schritt herzustellen (LEVITT et al. 1969, OUDEMANS 1969, KLEIN WASSINK 1971, DENISSEN 1979, DENISSEN et al. 1980 a).

Beim Schlickergußverfahren wird der noch nasse Bodensatzkuchen in die gewünschte Form gegossen oder wie Tonerde gestaltet und nachträglich bei $80 - 105^{\circ} \text{C}$ zum Grünkörper getrocknet (JARCHO et al. 1976, 1979 (β -TCP), TAGAI u. AOKI 1980).

Die beschriebenen Methoden eignen sich für die Herstellung dichter Werkstoffe. Für Knochenersatzwerkstoffe ist es jedoch von Vorteil, eine gewisse Makroporosität in das Implantat einzuführen, um auf diese Weise dem Knochen ein Einwachsen in die Poren zu ermöglichen. Damit werden Haftung, Kraftübertragung und -verteilung verbessert. Gleichzeitig soll ein knöchernes Durchwachsen ermöglicht werden. Poren und deren verbindende Engpässe müssen hierzu jedoch gewisse Minstdurchmesser aufweisen, die dem Osteon als histomorphologische Knocheneinheit gerecht werden. KLAUITTER u. HULBERT (1971) sowie HULBERT et al. (1970, 1972) geben als Minstdurchmesser $100 \mu\text{m}$ an. Poren unter $100 \mu\text{m}$ erlauben das Hinein-, ggf. das Hindurchwachsen von Osteoid, während niedrigere Durchmesserwerte (ca. $40 \mu\text{m}$) nur noch fibröses Gewebe oder gar keines zulassen.

Bei calciumphosphatkeramischen Werkstoffen kommen neben der Korallentechnik zum Poreneinbau zwei Verfahren zum Einsatz. Wird die Formgebung durch Pressen erreicht, so können Calciumphosphatpulver gleichmäßig mit Materialien vermischt werden, die sich unterhalb der Sintertemperatur aus dem Grünkörper sublimieren - z. B. Naphthalin (DRISKELL et al. 1973) - oder daraus verdunsten bzw. abschmelzen - z. B. Bienenwachslösung, Calciumstearat (DUFF u. GRANT 1980). Bei NEWSELY u. OSBORN (1980) fand das von RYSHKEVITCH (1953) entwickelte Verfahren Verwendung, wobei die Zersetzung eines einverleibten H_2O_2 -Polyvinylalkohol-Gemisches interkonnektierende Makroporen hinterläßt.

Die Einführung von Makroporen bringt naturgemäß entscheidende Ein-

flüsse auf das mechanische Verhalten des Implantatwerkstoffes mit sich. Die Festigkeit wird exponentiell unterminiert, anfangs verhältnismäßig stärker als bei weiterer Porositätszunahme (Abb. 2).

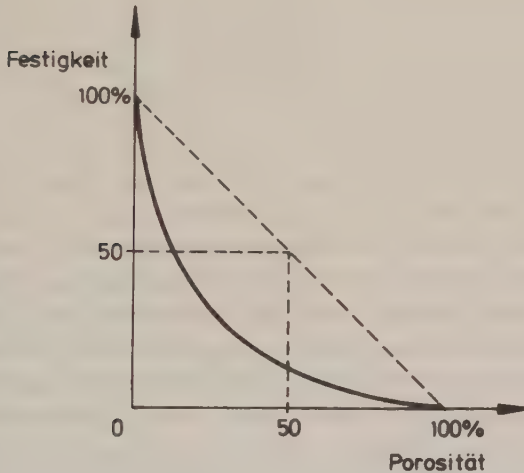


Abb. 2

Einfluß der Porosität auf das mechanische Festigkeitsverhältnis eines Implantatwerkstoffes

Wächst Gewebe in das Implantat ein - ggf. hindurch - so kann die Festigkeit durch das entstandene strukturelle Gefüge - Gewebe und Implantat (composite) - zumindest teilweise wiederhergestellt werden. Diese Festigkeitswiederherstellung ist umso günstiger, je niedriger die ursprünglichen Festigkeitswerte lagen. Nach der Composite-Werkstoff-Mechanik (ANDREWS 1980, HARRIS 1980) hängt die mechanische Qualität des Komplex-Gefüges sowohl von der Stärke des Gewebe-Implantat-Verbundes als auch von der biomechanischen Qualität der Gewebekomponenten ab.

Nach Formgebung und - falls notwendig - Trocknung werden die aus mehr oder weniger dicht gepackten Partikel bzw. Kristalliten bestehenden Preßlinge einer speziellen Wärmebehandlung, **S i n t e r n** genannt, unterzogen, wodurch die Grünkörper durch Reaktionen im

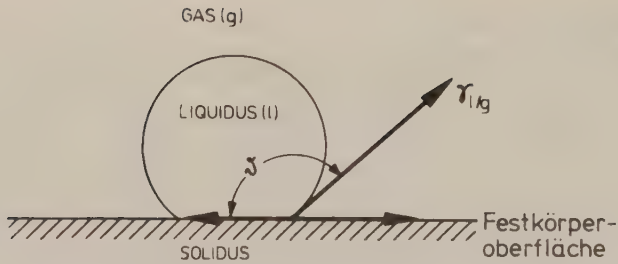
festen Zustand zu festen, belastbaren Keramik-Implantat-Werkstoffen werden. Dies geschieht bei Temperaturen um $2/3$ bis $3/4$ der absoluten Schmelztemperatur der betreffenden Pulver (ZAPF u. DALAL 1982, KIEFFER u. BENESOVSKY 1980). Wie bei den Tonerde- und Glaskeramiken binden die niedrigere Schmelztemperaturen aufweisenden Glasphasen vermutlich die übrige Kristallphase zusammen. Bei Calciumphosphatkeramik-Werkstoffen werden die zu sinternden Körper unterhalb der jeweiligen Umwandlungs- und Schmelztemperatur calciniert, wobei die "Verkittungssubstanzen" möglicherweise hypokristallisierte Metaphosphate darstellen.

Die mechanischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften des Fertigproduktes spiegeln Qualität der Ausgangsstoffe und Sinterbedingungen wider. So soll z. B. die Abkühlungsgeschwindigkeit des gesinterten Produktes entscheidenden Einfluß auf das Lösungsverhalten des Werkstoffes haben. Da sich die Angriffsanfälligkeit der Verbundphase direkt proportional zur Abkühlungsgeschwindigkeit verhält (OSBORN u. NEWESELY 1980), müssen die Kühlbedingungen optimal gesteuert sein. Wie bei Metallen stellen auch bei keramischen Werkstoffen die Korngrenzen einen *locus minoris resistentiae* dar. Beim Sintern erfolgt das Kristallwachstum vermutlich durch Fusion, Sublimation, Bildung anderer Phasen bzw. anderer Reaktionen, die durch Spaltung innerhalb des HA zustandekommen (KRAJEWSKI u. RAVAGLIOLI 1981). Die Prozesse, welche das Kristallwachstum im Bereich der Sintertemperatur steuern und dem zu sinternden Körper mechanische Belastbarkeit verleihen, sind bis heute nicht präzisiert. Unklar ist, inwieweit sie kombiniert, alleinig bzw. aufeinanderfolgend ablaufen. In den Bereich der Theorie fallen auch die Material-Transportmechanismen, wie Viskös-Fließen, Kondensation, Oberflächen- und Volumen-Diffusion (ROOTARE u. CRAIG 1978), die zur stegförmigen Kernverbindung (neck formation) führen und für das Dichtwerden des Sinterlings verantwortlich sind. Experimentell sind Sintertemperaturen von 900°C (RAO u. BOEHM 1974, KRAJEWSKI u. RAVAGLIOLI 1981) bis 1400°C (PEELEN et al. 1977, 1978) erprobt worden mit variierenden Sinterzeiten von 15 Minuten bis 48 Stunden (KRAJEWSKI u. RAVAGLIOLI 1981).

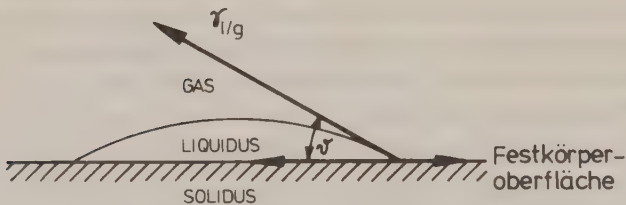
2.4.3 Oberflächeneigenschaften

Ebenso maßgebend wie das mechanische Verhalten sind für die Implantation - wenn auch sehr oft vernachlässigt - die Oberflächeneigenschaften der Implantate. Ob, wie und welche Zellen an eine gegebene, nicht biologische Festkörperoberfläche Anschluß finden werden, hängt von den chemischen, physikalischen und elektroenergetischen Eigenschaften der Festkörperoberfläche ab. Die Eigenschaften stehen in gegenseitiger Beziehung und sind oftmals miteinander untrennbar verknüpft. Die Grenzschichtreaktionen können dabei aber nur eine Widerspiegelung der Wechselwirkungen zwischen Implantatoberfläche und Implantatlagergewebe sein. Die initiale Wirkung extrazellulärer Flüssigkeiten und ihrer Komponenten auf das Implantat sowie die späteren Wechselwirkungen zwischen Implantat und Lager beeinflussen mechanische Stabilität und biologische Kompatibilität des Werkstoffes durch die Gesamtheit der materialspezifischen physikalischen, chemischen und strukturellen Oberflächenparameter (KAWAHARA et al. 1968, HULBERT et al. 1971, HENCH u. ETHRIDGE 1975, 1982 b, WOLF 1981).

Unter **O b e r f l ä c h e n e n e r g i e** versteht man Freiergie, welche auf das Ungesättigtsein der Oberflächenatome zurückzuführen ist. Die spezifische Oberflächenenergie ist umso höher, je größer die zwischenmolekularen Kräfte der nicht-biologischen Oberfläche sind. Sie entscheidet über die Benetzbarkeit der Festkörper-Oberfläche. Mit hohen spezifischen Freiergie-Werten nimmt die Benetzbarkeit zu. Bei niedrigen Werten breitet sich dagegen aufgebrachte Flüssigkeit nicht aus und nimmt Tropfenform an (Abb. 3). Al_2O_3 -Keramik, TiO_2 und HA-Keramik besitzen hohe Oberflächenenergiekoeffizienten (HULBERT et al. 1971, HENCH u. ETHRIDGE 1975) und sind aufgrund dessen gut anfeuchtbar. Aufgebrachte Flüssigkeit und anorganische Oberfläche streben generell einen Zustand geringster Energie an (2. Grundsatz der Thermodynamik). Der Verbreitungskoeffizient sagt demnach aus, inwieweit sich Flüssigkeit auf der Oberfläche ausbreitet bzw. zu einem Tropfen zusammenzieht.



nicht anfeuchtbar:
(geringe Energie $-\gamma_{l/g} > \gamma_c$)
Kontaktwinkel $\vartheta > 90^\circ$



anfeuchtbar:
(hohe Energie $-\gamma_{l/g} < \gamma_c$)
Kontaktwinkel $\vartheta < 90^\circ$

Abb. 3

Benetzbarkeit einer Oberfläche abhängig von der Oberflächenenergie des Werkstoffes

HULBERT et al(1971) sowie HENCH u. ETHRIDGE (1982 c) haben auf die Bedeutung der kritischen Oberflächenspannung für Implantate verwiesen. Die kritische O B E R F L Ä C H E N S P A N N U N G γ_c wird definiert als der Energiewert einer Festkörperoberfläche bei dem der Cosinus des Kontaktwinkels gleich 1 ist. Hat Flüssigkeit eine Liquidus-Gas-Oberflächenspannung $\gamma_{l/g} > \gamma_c$, so kommt Verbreitung nicht zustande, wohingegen eine Flüssigkeit mit

$\gamma_{1/g} < \gamma_c$ sich auf der Oberfläche verbreiten wird. So konnten KAWAHARA et al. (1968) zeigen, daß sich Zellkulturen durch ein hohes γ_c positiv beeinflussen lassen.

Verteilung und Dichte der Oberflächenladung bestimmen weitgehend die Zusammensetzung des in vivo adsorbierten Films extrazellulärer Flüssigkeit und der darin suspendierten Komponenten (WOLF 1981) und den Endladungszustand unter statischen Bedingungen. Unter dynamischen Bedingungen entsteht das sogenannte Zeta-Potential. Dadurch können Gegenionen in der Grenzschicht unter Umständen eine Ladungsvorzeichenumkehr verursachen.

Bezüglich der Adsorption bei implantierten Calciumphosphaten ist festzustellen, daß die Realkristalle von Apatiten Oberflächendefekte und -dislokationen besitzen. Deshalb adsorbieren sie je nach ihrer Dichte und reaktionsverfügbaren Fläche Anionen sowie Kationen (SHIMABAYASHI et al. 1981, 1981 a). HA findet deshalb breite Anwendung in der Chromatographie.

In metastabilen wässrigen Lösungen von CaPO_4 katalysiert HA die Phasenumwandlung



sowie in vivo (GLIMCHER 1976, NEUMAN 1980) als auch in vitro (DOI et al. 1984, AOBA u. MORENO 1984), sekundäre Keimbildung genannt. Die Festkörperapatite sind dabei in übersättigten Calciumphosphatlösungen imstande, katalytisch als Substrat (Keim) zu dienen, worauf sich eine feste Apatitphase niederschlagen kann. Das heißt, zu den Eigentümlichkeiten des Apatites gehört die Fähigkeit, eine katalytische sekundäre Fällung in geeigneter Calciumphosphatlösung zu initiieren und zu fördern.

2.4.4 Bioaktivität des Hydroxylapatits

Die Entwicklung von Werkstoffen für die Humanimplantation läßt hinsichtlich der Implantateigenschaften drei Trends erkennen.

- a) Primär galt das Hauptaugenmerk den mechanischen Eigenschaften. Hier boten sich metallische Werkstoffe als die greifbarsten und geeignetsten an, bis man auf die Bedeutung der Korrosion durch elektrochemische Prozesse - sowohl für Implantatlayer als auch für den Werkstoff - kam. NICOLE (1947) wies in seiner

Monographie darauf hin, daß ein Implantatwerkstoff neben geeigneten physikalischen Eigenschaften auch im Hinblick auf sein mechanisches Verhalten im Körpermilieu befriedigen muß. Im Zuge der Beurteilung dieser sog. **Bioeigenschaften** kam es zur Unterscheidung zwischen **toxischen** und **biokompatiblen** Materialien. Toxische Werkstoffe scheiden im Körpermilieu Substanzen ab, die durch lokale oder/und systemische Schädigung des Organismus zum spontanen Verlust bzw. zwangsläufigen Entfernen des Implantates führen. Auch biokompatible Werkstoffe sondern toxische Substanzen ab, jedoch in Raten und/oder Mengen und mit spezifischen Wirkungen, die der Körper bei normalen Abwehrmechanismen tolerieren kann.

- b) Diese Erkenntnisse gaben den Anstoß, nicht nur mechanische Parameter zu beachten, sondern auch nach möglichst **inerten** Implantatwerkstoffen zu suchen. Vollständig inerte Materialien könnten eine Beeinträchtigung des Lagergewebes durch Zerfallprodukte des Implantates ausschließen. Es ist bislang jedoch nicht gelungen, inerte Implantate aus Metall oder Kunststoff zu erzeugen (DIELERT 1982, 1983 a, b; DIELERT et al. 1981, 1983). Bezüglich der inerten Eigenschaften sind keramische Werkstoffe - Erzeugnisse aus hochoxidierten Ausgangsstoffen sowie Kohlenstoff - bisher allen anderen unumstritten überlegen. Kunststoff- und Metallimplantate dagegen werden unter Abkapselung mittels minderwertigen Gewebes (Abgrenzungsreaktion des Organismus) z. B. im Knochen als Fremdkörper toleriert. Daher ihre Bezeichnung als **biotolerant**. Keramische Werkstoffe werden aufgrund ihres relativ neutralen Verhaltens als **bioinert** bezeichnet. Titan besitzt die unausbleibliche Neigung, an der Oberfläche zu oxidieren, wodurch es immer mit dem hochoxidierten TiO_2 umhüllt ist. Es kommt deshalb bei biologischer Wertung der Wechselreaktionen zwischen Implantat und Lager den keramischen Werkstoffen nahe.
- c) Neuere Bestrebungen im Zuge des alloplastischen Knochenersatzes sind dahingehend ausgerichtet, einen Verbund mit dem Knochen zu erreichen. Im Gegensatz zu der "Inert-Theorie" soll sich das Implantat aktiv an den histokinetischen Ereignissen beteiligen, "als wäre es äquivalent zum Wirtgewebe" (HENCH u. ETHRIDGE 1975, 1982 c).

Das hat zu Entwicklungen von Implantatwerkstoffen geführt, die mit den Termini *b i o a k t i v* bzw. *o b e r f l ä c h e n r e - a k t i v* (surface reactive) beschrieben werden. Über diese Eigenschaften scheinen die gesinterten Calciumphosphate sowie Biogläser und Glaskeramiken zu verfügen. Dabei verdanken Biogläser und Glaskeramiken ihre "Oberflächenaktivität" der Ausscheidung - bei Herstellung einverleibter - Calciumphosphate an die Implantatoberfläche. In Bezug auf mögliche lokale und/oder systemische Wirkungen keramischer Werkstoffe aus Calciumphosphaten sei eine Anmerkung über ihre eventuell "Korrosionsprodukte" - Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen - gemacht. Ca^{2+} -Ionen wirken im Tierreich bei überwältigend vielen und verschiedenartigen Reaktionen der Regulations- und Alarmmechanismen mit, wie Muskelkontraktion, Nervenleitung, Ausscheidungsprozesse und hormonale Reaktionen (NEUMAN 1980). Noch erstaunlicher ist die Genauigkeit, mit welcher deren Serumkonzentration - ohne Rücksicht auf Tierart, Alter oder Nahrungseinnahme - innerhalb streng begrenzter Werte geregelt ist. Die Konzentration freien, biologisch aktiven Ionenserumcalciums beträgt fast immer 1,25 mM (NEUMAN 1980). Dagegen werden Schwankungen des Gesamtgehaltes von anorganischem Phosphat im Serum toleriert, wenngleich für physiologische Bedingungen eine Verteilung von HPO_4^- : $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$: PO_4^{3-} = ca. 80 % : 20 % : 0,01 % gilt.

Wird ein Implantat ins Knochenbett eingesetzt, so vermag der sich bildende Knochen an das Implantat heran, an ihm empor oder hinein bzw. hindurch (sofern porös) zu wachsen. Der Grad dieses Wachstums ist auch als Ausdruck der Affinität jungen Knochens zu den Festkörpern aufgefaßt worden, und hat zu Bezeichnungen wie *o s t e o - k o n d u k t i v*, *o s t e o t a k t i s c h*, *o s t e o - t r o p*, *o s t e o i n d u k t i v* und *o s t e o g e n e t i s c h* geführt. Im Gegensatz zu den übrigen Eigenschaften setzen Osteoinduktion und Osteomorphogenese eine im Implantat enthaltene aktive Substanz voraus. Diese stellt eine lokale Umwelt her, wohin im Stroma befindliche mesenchymständige Stammzellen der knochenbildenden Zell-Linie angezogen werden. Gleichzeitig werden die Stammzellen zur Differenzierung und Reifung zu Chondrozyten und Osteoblasten befähigt (URIST 1980) - auch da, wo normalerweise kein Knochen wächst (s.5.4). Per definitionem besagt dies , daß

Implantate aus Kunststoff, Metall und Keramik keine osteogenetische bzw. osteoinduktive Potenz besitzen können.

2.5 Knochenaufbau und -entstehung

Knochen gehört histologisch und funktionell zu den Skelettgeweben, wozu auch Knorpel, Zahnschmelz, Dentin und der Zahnzement zählen. Der Knochen ist von einer dichteren Rinde - Compacta - umgeben, die zum Zentrum hin in eine schwammförmige Struktur - Spongiosa - übergeht. Die Compacta ist von einer knochenerzeugenden Membran - dem Periost - umhüllt. Das Periost besteht aus zwei Schichten, einer der Knochenoberfläche zugewandten Keimschicht - stratum osteogeneticum - und einer äußeren Faserschicht - stratum fibrosum. Die Spongiosa stellt ein dreidimensionales Netzwerk aus quer- und längsverlaufenden Knochenbälkchen - Trabekeln - dar, und umgibt die Markhöhle. Knochenmark füllt die Markhöhle sowie die intra-trabekulären Räume aus. Mechanisch gesehen stellt Knochen das Schutz- und Stützgerüst dar, homöostatisch kann er als Mineralquelle dienen und regelt den Calcium- und Phosphatstoffwechsel. Als Organ gehört er zum hämatopoetischen System. Nach mikroskopischer Ordnung und Alter sind Geflecht- und Lamellenknochen zu unterscheiden.

- a) Den Geflechtknochen - auch Faserknochen genannt - charakterisieren ungeordnete Kollagenorientierung und unregelmäßige Lakenverteilung. Knochen bildet sich zunächst in der Geflechtform, die erst nach Abbau durch Osteoklasten von der Lamellenform ersetzt wird. Geflechtknochen stellt im allgemeinen ein Durchgangsstadium dar und wird dort angelegt, wo genetische, induktive oder mechanische Faktoren ein schnelles Knochenwachstum bedingen. So entsteht z. B. bei der Bruchheilung innerhalb des defektüberbrückenden Kallus der Geflechtknochen als Vorläufer lamellären Knochens. Wegen der mangelhaften Faserorientierung ist Geflechtknochen mechanisch isotrop und weniger zugbelastbar als der anisotrope Lamellenknochen. Überdies enthält junger Knochen mehr Wasser auf Kosten des Minerals (ROBINSON 1975) und hat einen niedrigeren Elastizitätsmodul als Lamellenknochen.

- b) Lamellenknochen ist der reife, tragfähige Knochen. Ihn charakterisieren besser geordnete Kollagenorientierung und regelmäßiger verteilte Osteozytenlakunen. Lamellenknochen kann sich nicht de novo bilden, d. h. er kann nicht dort entstehen, wo vorher kein knöchernes Gewebe vorhanden war. Sowohl Compacta als auch reife Spongiosa bestehen aus lamellärem Knochen (unreife Compacta gibt es nicht!).

Eine besondere histomorphologische Einheit des Lamellenknochens ist das **Osteon**, auch **Havers'sches System** genannt. Das Osteon hat idealisiert die Form eines 3 - 5 mm langen und 150 µm im Radius messenden Zylinders. Die Wand des Zylinders bilden sperrholzartig konzentrisch angeordnete Lamellen, die das zentral gelegene Havers'sche Nerv-Gefäß-System umgeben. Die longitudinal verlaufenden Hauptgefäße stehen bei benachbarten Osteonen durch ein Netzwerk von kleineren - den sog. **Volkmann'schen Gefäßen** - miteinander in Verbindung. Diese Anastomosengefäße liegen in den gleichgenannten Kanälen mit Durchmessern von ca. 0,4 µm. In histologischen Querschnittspräparaten sind die jeweiligen - einem Osteon zugehörigen - Osteozyten radial dem Zentralgefäß zugeordnet und liegen in **Lakunen**. Die Osteozyten sind interlamellär angeschlossen und kommunizieren durch zahlreiche Ausläufer - etwa 64 pro Zelle (BOYDE 1972). Die Lamellen wachsen von der Peripherie zum Zentrum des Osteons. Zwischen den im Querschnitt mehr oder weniger kreisförmigen Osteonen befinden sich die von Resorption verschont gebliebenen sog. **Schaltlamellen**.

Die Zusammensetzung betreffend, besteht Knochen - wie jedes Stützgewebe - aus Zellen und interzellulärer Substanz, der Matrix. 5 - 8 % des Knochenvolumens fallen den Knochenzellen zu. Hierzu zählen Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Ruhende **Osteoblasten** liegen epithel- bis schindelartig übereinander oder sind säulenförmig an der Knochenoberfläche angeordnet. Sie sondern die gesamte organische interzelluläre Substanz des Knochengewebes ab. Gleichzeitig wird ihnen eine Rolle bei der Einleitung des Kalzifikationsprozesses zugeschrieben. Sie sollen auch am Stoffwechsel der im Skelett befindlichen zwischenzellulären und den übrigen extrazellulären Körperflüssigkeiten beteiligt

sein. Längere Zeit sind Osteoblasten und Osteoklasten als Varianten der gleichen Zellart - oder zumindest aus der gleichen Stammzelle hervorgehend - aufgefaßt worden. Beide Zellarten sollten demnach dem retikuloendothelialen System entstammen. Einzelheiten bezüglich der genauen Herkunft sind jedoch weder für die eine noch für die andere Zellart festgelegt. Neuere Erkenntnisse legen nun eine unterschiedliche Abstammung nahe. Demgemäß stammen Osteo- sowie Chondroblasten von einer unterschiedlich bezeichneten Stammzelle ab, die ortsverbunden, pluripotentuell und im Gewebe sehr weit verbreitet sein soll. Geläufige Bezeichnungen sind "osteoprogenitor cell" (FRIEDENSTEIN et al. 1968), "stroma cell" (OWEN 1970, 1980, 1982) und "skeletoblast" (STUTZMANN u. PETROVIC 1982). Die Osteoklasten werden dabei dem hämatopoetischen System - d. h. der zirkulierenden Monozyt-Makrophagen-Zelllinie zugeordnet (OWEN 1970, 1978, 1980; GÖTHLIN u. ERICSSON 1976, ASH et al. 1980, CHAMBERS 1980). Bei normalen Knochenumbauvorgängen liegt zwischen der Absonderung kalzifizierbarer organischer Matrix (Osteoid) und der Ablagerung anorganischer Matrix ein Zeitraum von 8 bis 10 Tagen. Das erklärt die Tatsache, daß zwischen Mineralisationsfront und Osteoblastenschicht eine Osteoidschicht angetroffen wird.

O s t e o z y t e n sind ehemalige Osteoblasten, die durch den Mineralisierungsablauf im Knochen eingeschlossen werden. In Knochenumbauzonen zählen sie bis zu $26000/\text{mm}^3$. Nach abgeschlossener Verkalkung befinden sie sich in Höhlen - den Lakunen - und halten durch Zellausläufer Kontakt zu benachbarten Osteoblasten. Die Ausläufer haben einen durchschnittlichen Durchmesser von $0,2\ \mu\text{m}$. Die Lakune ist pflaumkernförmig gestaltet und hat durchschnittliche Durchmesser von $20 \times 10 \times 5$ bis $27 \times 13 \times 7\ \mu\text{m}$ (BOYDE 1972). In der Kompakta von Röhrenknochen z. B. liegt der Osteozyt zwischenlamellär und ist mit den kürzeren Kanten kranial-kaudal und dem kürzeren Durchmesser radial ausgerichtet. Dabei sind die Osteozyt-Konvexitäten den Lamellenwänden zugewandt. Osteoklasten befreien durch ihre Knochenresorptionstätigkeit die vorher eingeschlossenen Osteozyten (JONES u. BOYDE 1977). Möglicherweise unterliegen sie dann einer Dedifferenzierung. Das endgültige Schicksal der Osteozyten ist jedoch bis heute weitgehend ungeklärt.

O s t e o k l a s t e n sind mehrkernige Riesenzellen, die auf Knochenresorption spezialisiert sind. Daß sie "Wanderzellen" dar-

stellen, scheint festzustehen. Sie sollen den lymphoiden Organen (WALKER 1973, 1975) bzw. dem hämatopoetischen System entstammen. Neuerdings will man die Osteoklasten den Fremdkörperzellen - Monozyten, Makrophagen - nahezu gleichsetzen (CHAMBERS 1980, PEASE 1982). Das Signal, das die Osteoklasten bewegt, Resorptionen durchzuführen, ist bislang nicht bekannt (CHAMBERS 1980). Ebenso im Dunklen geblieben ist der Rückkoppelungsmechanismus, der die Resorptionstätigkeit abbruft. Knochenumbau geht in kleinen diskreten Zonen - von FROST (1980) als "Bone Multicellular Units" bezeichnet - vor sich. Bei erhöhtem Parathormon-Spiegel z. B. ist der Knochenumbau beschleunigt. Dabei nehmen sowohl Aktivität der einzelnen Osteoklasten (MILLER 1978, WEZEMAN et al. 1979) als auch ihre Zahlen (BINGHAM et al. 1969, TATEVOSSIAN 1973) zu.

Aus morphologischer Sicht bestehen zunächst zwei Formen, zwischen denen ein breites Spektrum von Übergangsformen anzutreffen ist (JONES u. BOYDE 1977). Demnach sind die nicht aktiven Osteoklasten vergleichsweise lang und dendritisch. Sie haben eine glatte Oberfläche. Die aktiven besitzen mit Fimbrien besetzte Ränder, während die freie Oberfläche mit Mikrovillen (Zotten) versehen ist. Die den Knochen berührende Oberflächenmembran ist faltig und mit zahlreichen Mikrovillen versehen. Das Merkmal am Knochen, welches auf Osteoklastentätigkeit hindeutet, sind die *Howship'schen* *Lakunen*. Das sind scharfkantige muschelförmig gestaltete Einbuchtungen, die an den der Resorption unterworfenen Knochenflächen anzutreffen sind.

Interzelluläre Matrix setzt sich generell aus Bindegewebsfasern, interstitiellen Flüssigkeiten und freien Elektrolyten zusammen. Da jedoch beim Knochen die organische zwischenzelluläre Substanz kalzifizierbar ist, gehört zur Knochenmatrix auch ein anorganischer Anteil.

Das Strukturprotein *Kollagen* beansprucht 64 (MATTHEWS 1980) bis 90 (TRIFFITT 1980) Gew. % des gesamten organischen Anteils - s. auch Tab. 3. Die Kollagenfaser entkeimt einer Kette intra- und extrazellulärer Reaktionen, und ist strukturell gesehen eine komplexe Kette von Aminosäureresten. Knochenkollagen zeichnet sich durch eine Hierarchie von ultra-, mikro- und makrostrukturellen Ordnungsstufen aus. Diese stellen dem Knochenmineral eine Leit-

bahn zur Ablagerung bereit, woraus die besonderen physikalischen und mechanischen Eigenschaften dieses Stützgewebes resultieren (KATZ 1971, 1980; SCHLÄPFER et al. 1980).

	Gew. %
Kollagen	79.2 - 88.9
Nicht-kollagene Proteine:	4.7 - 9.5
Sialoproteine	0.36 -
Albumin	0.60 - 1.79
Glykoproteine (alkalische Phosphatase, Fibronectin)	3.72 - 8.35
Glutaminsäurehaltige Proteine (Osteokalzin)	1.0
Phosphoproteine	0.20
Nicht-proteine Bestandteile	
Mykopolysaccharide	0.370 - 0.530
Phospholipide	0.007
Proteoglykane	0.24 - 1.66
Andere	1.56 - 4.9

Tab. 3

Organische Bestandteile der knöchernen interzellulären Matrix (in Anlehnung an URIST, 1976)

Knochenkollagen ist eine kristalline polymere Verbindung, dessen Monomer - Tropokollagen - drei sog. α -Aminosäureketten ausmachen. Die Ketten bestehen aus je 100 Aminosäureresten. Jeweils zwei Aminosäureketten sind identisch und werden mit α_1 bezeichnet, während sich die dritte in der Zusammensetzung unterscheidet und die Bezeichnung α_2 trägt. Diese Zusammenstellung von Aminosäureketten unterscheidet Knochenkollagen von dem in anderen Bindegewebsmatrixen befindlichen Kollagen. Die drei um ihre eigene Achse helixisch links gewundenen α -Ketten winden sich noch einmal rechts - in der Form einer ausgedehnten Dreierhelix (Tripelhelix) - zu monomerem Tropokollagen umeinander. Tropokollagenmoleküle lagern sich als pentamere Mikrofibrillen zusammen. Diese schließen sich zu Fibrillen und weiter zu Fasern und Bündeln zusammen. Das Tropokollagenmolekül ist 3.000 Å lang und hat einen Durchmesser von 15 - 16 Å. Mikrofibrillen haben einen Durchmesser von 44 Å. Die bei Knochenkollagen beobachtete Querstreifung mit nominaler

Periodizität von 640 - 750 Å soll ihre Erklärung in einer viertel-versetzten Einbauanordnung des Tropokollagens finden (GLIMCHER 1976, TRIFFITT 1980, KUHLMAN 1980). Andere Untersucher (GOTOH et al. 1983) interpretieren die Querstreifungen als ein Merkmal der "amorphen Kollagen-Hülle". Der Durchmesser von Knochenkollagenfasern nimmt mit zunehmendem Alter zu. Bei Neugeborenen liegt er zwischen 380 - 530 Å, beim Erwachsenen um 800 Å und bei älteren Menschen um 1.000 - 1.500 Å (ROBINSON u. WATSON 1955). Zur organischen Knochenmatrix zählen noch nicht-kollagene Proteine und nichtproteine Bestandteile (s. Tab. 3).

Anhand chromatographischer, solubilitätskinetischer, morphologischer und struktureller Beobachtungen ist den verschiedenartigen organischen Knochenmatrixbestandteilen eine Rolle beim Verkalzungsprozeß zugeschrieben worden. In extrazellulärer Knochenmatrix befindliche Makromoleküle sollen auf noch ungeklärte Art und Weise die Kalzifikationsvorgänge steuern. Das soll geschehen, indem sie:

- Epitaxie-Stellen für das Apatitkristallwachstum bereitstellen
- als Kristallisationskeim für Hydroxylapatit wirken
- die Vorstufen von Apatit stabilisieren, d. h. weitere Bildung zum Apatit hemmen und/oder
- die Größe und Orientierung des niedergeschlagenen Minerals regulieren (BOSKEY 1981).

Die i n t e r s t i t i e l l e n F l ü s s i g k e i t e n und f r e i e n E l e k t r o l y t e kalzifizierender Gewebe lassen sich im großen und ganzen - bis auf Proteinart bzw. -konzentration - mit den übrigen extrazellulären Flüssigkeiten (z. B. dem Serum) vergleichen (NEUMAN 1980). Außer Ca^{2+} -, PO_4^{3-} - und OH^- -Ionen finden sich auch CO_3^{2-} -, Mg^{++} -, Na^{+4} -, F^- -Ionen, Citrat sowie Spuren anderer Substanzen. Diese Ionen sind auch dem Knochenmineral in verschiedenen Konzentrationen beigemischt. Hinsichtlich des Ionengehaltes von Calcium und anorganischem Phosphat (H_2PO_4^- , HPO_4^{--} , PO_4^{3-}) stellen die interstitiellen Flüssigkeiten ein metastabiles System dar. Das besagt, daß das System übersättigt ist und sich nicht beim Minimum der Freien Enthalpie befindet. Unter Voraussetzung der Einführung von Aktivierungsenergie ist somit der Übergang vom Ionenzustand zu festen Calciumphosphaten prinzipiell möglich. Anders ausgedrückt, liegen die dabei

vorhandenen Mengen - in Ionenprodukten angegeben - zwar unterhalb des spontanen Niederschlagspunktes, jedoch weit oberhalb der Konzentrationswerte, die Kristallwachstum zu fördern im Stande sind.

Knochenmineral besteht zur Hauptsache aus Hydroxylapatit. HOPPE (1862) stellte diese Hypothese auf, welche von DE JONG (1926) anhand von Röntgenbeugungsuntersuchungen am Knochen bestätigt werden konnte. Der Karbonatgehalt nimmt mit zunehmendem Alter von 3 auf 6 % zu. Lange ist darüber diskutiert worden, in welcher Form das Karbonat vorliegt. Derzeit wird der teilsubstitutionelle Einbau von CO_3^{--} für PO_4^{3-} im Apatitgitter angenommen (MCCONELL 1952, 1981 a, b; MCCONNELL u. FOREMAN 1978). Diese Zusammensetzung läßt sich mit dem natürlich vorkommenden Mineral Dahllit (Tab. 2) vergleichen. In vivo tritt HA ausschließlich in Kristallitform auf, generell kaum länger als einige Hundert Å. Apatitkristallite werden als feinbauliche Einheiten der Calciumphosphat-Mineralien bei Zahn- und Knochensubstanz angenommen. Weder über Habitus noch Kristalldimension stimmen die Literaturangaben überein. Anhand transmissionselektronenmikroskopischer (TEM-) Untersuchungen kamen ROBINSON u. WATSON (1952, 1955) sowie WATSON u. ROBINSON (1953) zu dem Schluß, daß Knochenapatitkristallite eine tafelförmige Gestalt besitzen. Für reife Kristallite geben sie durchschnittliche Dimensionen von $1.500 \times 500 \times 100 \text{ Å}$ an. FERNANDEZ-MORAN u. ENGSTRÖM (1957) interpretieren dagegen ihre TEM-Ergebnisse im Sinne von Nadel- bzw. Stäbchenform der Apatitkristalle. Außer diesen Stäbchen mit Ausmaßen von $30 - 60 \times 200 \text{ Å}$ beschreiben sie Kristallitflocken ($20 - 50 \times 300 - 500 \text{ Å}$), die sie als "laterale Zusammenlagerungen" von nadelförmigen Kristalliten zu erklären versuchen. BOCCIARELLI (1970) fand Kristallite von $20 - 40 \text{ Å}$ im Durchmesser und einige Hundert Angström Länge. In den von ihm beobachteten plättchenförmigen Kristalliten ($40 \times 600 - 700 \text{ Å}$) will er den Beweis für das Vorhandensein von Octacalciumphosphat im Knochen gefunden haben.

Röntgenbeugungsuntersuchungen am Knochen scheinen die Nadelform der Apatitkristallite zu bestätigen. Dabei soll die lange Kristallitachse parallel zum Kollagenfaserzug liegen. Um dieses Phänomen zu erklären, wird der Kollagenfaser ein wachstumsorientierender Einfluß - die sog. Epitaxie - auf entstehende Apatitkristallite

zugeschrieben (SCHMIDT 1947 b, NEUMAN u. NEUMAN 1958, GLIMCHER 1976). Es gibt jedoch auch Untersucher, die der Zusammensetzung des Knochenminerals aus diskreten Einzelkristalliten widersprechen. Gegen epitaxiale Entstehung von Knochenkristalliten - "homogene Verkalkung" - sprachen schon die sog. Mandlschen Körperchen in Schuppen von Knochenfischen und die Globuli (Arkaden und Halbmondfelder) im Dentin (SCHMIDT 1947 a, b). Hier handelt es sich nämlich um kugelige Calciumphosphat-Gebilde - Calcosphäriten -, woraus die Bezeichnung "sphäritische Verkalkung" resultiert. SCHMIDT (1947 b) vermutet, daß bei überstürzter Kristallisation sphäritische Verkalkung begünstigt werden müßte, da die Kollagenfasern den orientierenden Einfluß kaum mehr ausüben können dürften. Bei langsamerer Abscheidung soll dagegen der orientierende Einfluß der Kollagenfibrillen besser zur Geltung kommen und homogene Verkalkung fördern. Seitdem sind sphäritische Calciumphosphatgebilde im Knochen von Mäusen (BERNARD u. PEASE 1969), Geflügel (MILLER u. SCHRAER 1975, GAY 1977), Ratten (BOYDE u. HOBDELL 1969 b, BOYDE 1972, SELA u. JAFFE 1977, TAKIGUCHI 1979), Hasen (EGAWA et al. 1980) identifiziert worden. Sie werden unterschiedlich mit Globuli, Calcosphäriten, Minicalcosphäriten, Knochenknoten (Knochen-)Mineralcluster, Sphären und Sphärulen bezeichnet.

Enteiweißung von Knochen führt zu einem festen spröden Mineralgerüst. Entkalkung hinterläßt bekanntlich ein hochelastisches Gerüst überwiegend aus Kollagenfasern. Das läßt die Vermutung zu, daß organische und anorganische Phasen jeweils für sich ein eigenes Gerüst bilden. Aufgrund rasterelektronenmikroskopischer (REM-) Untersuchungen an ionengeätzten Querschnitten von Schweine- und Menschenknochen fassen TURNER u. JENKINS (1981) sowie RALIS u. TURNER (1981) den Feinbau des Knochenminerals als kontinuierliches Ultraskelett auf. Das wurmförmige Erscheinungsbild sei aus sphäroidalen Segmenten mit Durchmesser von ca. 0,1 μm zusammengesetzt. Die enthaltenen Kristallite seien Defektapatit.

Amorphe Strukturen im Knochen nehmen mit zunehmendem Alter ab, bis schließlich eine Kristallinität von 70 - 80 % erreicht ist. Neugebildeter Knochen stellt sich bei der Röntgenbeugung als amorph dar. Atome und Moleküle in dem Festkörper weisen keine dreidimensionale sich regelmäßig wiederholende Ordnung auf, oder

es besteht eine Kurzstreckenordnung, bei der die Zwischenabstände unterhalb des Auflösungsvermögens der Röntgenstrahlen bleiben. Fernerhin besteht die Möglichkeit, daß Atome und Moleküle zwar regelmäßig im Raum verteilt sind, die Festkörpereinzelpartikel jedoch zu klein sind, als daß sich ein kohärentes Diffraktionsmuster ergeben könnte. Liegt eine Kombination der beiden aufgezeigten Zustände vor - Festkörperphase zeigt sowohl unregelmäßige Verteilung der Bausteine als auch winzige Partikel - so wird die Probe naturgemäß von der Röntgenbeugung als amorph registriert.

Bezüglich der Massenzunahme der Mineralphase werden in der Literatur einheitliche Angaben gemacht. Sie soll durch Zunahme an Partikelzahl - Multiplikation - oder Zunahme an Partikelgröße - Wachstum - bzw. durch eine Kombination von den beiden erfolgen (GLIMCHER 1976). ROBINSON u. ELLIOTT (1957) sowie ROBINSON (1975) konnten zeigen, daß bei Verkalkung Erdsalze das im Osteoid enthaltene Wasser ersetzen. Im "voll"-mineralisierten Knochen bleiben jedoch 6 - 8 % des theoretisch ersetzbaren Gesamtwassers adsorbiert. "Voll"-mineralisierter Knochen enthält deshalb nur 92 - 94 Gew.-% des "vollständigen" Mineralgehaltes (Tab. 4).

	Gew. %	Vol. %
Wasser (Dichte 1.0)	6	12
Mineral (Dichte 3.0)	70	51
Organische Matrix (Dichte 1.41)	24	37

Tab. 4

Zusammensetzung reifen Knochens (nach ROBINSON et al. 1973)

Bei Knochenentstehung (Osteogenese) nehmen die osteogenetischen Zellen mesenchymaler Herkunft eine epitheloide Ordnung an bereits existierenden Strukturen an. Diese Notwendigkeit eines Leitgerüstes scheint auch für Knochenentstehung unter in vitro Bedingungen unerläßlich zu sein (TIBONE u. BERNARD 1982).

2.5.1 Primäre Knochenentstehung

Primärer (embryonaler) Verknöcherung geht Knorpel- oder Mesenchymgewebebildung voraus. Demnach lassen sich Enchondrale bzw. Desmale Ossifikation unterscheiden. Extremitätenskelett, Wirbelsäule und Schädelbasis fallen dabei der enchondralen Art zu, während desmale Knochen den Rest des Gesichtsschädels bilden. Röhrenknochen dienen

als klassisches Beispiel enchondraler Ossifikation. Das gesamte Skelett beim Fetus besteht bis zur 6. Lebenswoche aus Knorpel. Dann tritt Verknöcherung durch sog. primäre Ossifikationszentren ein. Gefäße drängen aus dem Periost zu den Ossifikationszentren vor. Die schon verkalkte Knorpelzone wird resorbiert und durch primäre Geflechtspongiosa ersetzt. Gleichzeitig fängt das zum Periost werdende Perichondrium an, rings um den mittleren Schaft Knochen zu bilden. Der Übergang zwischen Knorpel und Knochen ist eine in den Knorpel fortschreitende histokinetische Welle, in der ruhende Knorpelzellen proliferieren, hypertrophieren und vor der Ossifikationsfront zugrundegehen. Das Ossifikationszentrum kann dabei als eine sich ausdehnende Knochenkugel aufgefaßt werden, deren Oberfläche die Umwandlungsschicht Knochen-Knorpel darstellt. Diese Vorgänge gleichen denen in der Epiphysenfuge. Diese sorgt für Längenwachstum des Röhrenknochens und läßt sich - Richtung Gelenk-Diaphyse - in 6 Zonen einteilen:

- a) Zone des ruhenden Knorpels - der in Gelenkknorpel übergeht bzw. bei abgeschlossenem Längenwachstum (22. - 24. Lebensjahr) der knöchernen Epiphyse angrenzt. Die Zone enthält Chondroblasten aus dem embryonalen Mesenchym.
- b) In der Proliferationszone findet aktive Zellteilung statt. Die dabei entstehenden Chondrozyten sind im Längsschnitt übereinander in Säulen ausgerichtet. Die Zellreihen sind durch Grundsubstanzsepten voneinander getrennt.
- c) In der Zone der Matrix-Synthese grenzt sich jeder Chondrozyt von den benachbarten durch Bildung neuer Knorpelmatrix ab. Die Matrix besteht aus in amorphe Grundsubstanz eingebetteten feinen Fibrillen. Chondrozyten sollen dabei Matrix-Vesikel erzeugen, die die bevorstehende Knorpelverkalkung triggern.
- d) In der Zone der Hypertrophie vergrößern sich die Chondrozyten. Die Knorpelmatrix wird dabei durch Mineralsalze aus den eindringenden Blutgefäßen verkalkt. Dadurch werden die Diffusionswege der Chondrozyten verlegt, wodurch sie mit der in c) gebildeten Matrix zerfallen.
- e) In der Zone der provisorischen Verkalkung werden die der Markhöhle nächstgelegenen Chondrozytenlakunen durch Chondroklasten "eröffnet" (BERGMANN 1962).

Spongiosa wird in die überbleibende schwammartige Struktur eingelagert. Die Säulensepten bleiben dabei vom Abbau weitgehend verschont und werden von jungem Knochen umschlossen.

- f) Die Zone der Ossifikation grenzt an die Metaphyse. Sie ist durch Resorption des Knorpelreste/Jungknochen-Gemisches und dessen Ersatz durch sekundären Knochen charakterisiert.

Der desmalen Osteogenese dient als Lagergewebe das embryonale Mesenchym. Die mesenchymalen Zellelemente ordnen sich zu einer kondensierten Schicht vielflächig gestalteter Zellen, die durch zahlreiche dünne Zellenfortsätze miteinander in Verbindung stehen. Bei fortschreitender Absonderung von Knochengrundsubstanz bildet sich eine zweischichtige Osteoid-Umhüllung, in der Gefäßelemente, Fibrozyten, Mesenchymzellen, Präosteoblasten und Osteoblasten zu finden sind. Die Osteogenese - Erzeugung von Osteoid und dessen Verkalkung - läuft unmittelbar ab, ohne daß osteoklastische Resorptionstätigkeit als Zwischenstufe stattfindet. Der vom Periost und Endost deponierte Knochen ist selbst beim Röhrenknochen desmaler Art.

2.5.2 Postnatale Knochenentstehung

Primärer Knochen entstammt direkt dem embryonalen Mesenchym. Postnatal entsteht Skelettgewebe bei wachstums- oder belastungsbedingter Knochenumstrukturierung, ektopischer Verknöcherung, induzierter Osteogenese, knöchernen Tumoren, der Fraktur- und Osteotomieheilung sowie der Inkorporation von Implantaten zum Knochenersatz. Diese Abläufe sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung (DIXON u. SARNAT 1982, PECK et al. 1984). Hypothetisch (OWEN 1978, 1980, 1982) wird eine mesenchymständige pluripotente Stammzelle angenommen (s. auch "Osteoblasten" 2.5). FRIEDENSTEIN et al. (1968) und FRIEDENSTEIN (1973) konnten zwei solcher Stammzelllinien identifizieren. Organe außerhalb des Skeletts enthalten in ihrem Stroma Zellen, die sich normalerweise immer wieder zu entsprechenden Geweben differenzieren. Unter Einwirkung von knocheninduzierenden Substanzen - z. B. entkalktem Knochen (MULLIKEN u. GLOWACKI 1975, 1981), "Bone morphogenetic protein" (URIST et al. 1982) - jedoch differenzieren sie sich zu Osteoblasten und Chondrozyten. Diese

Stammzellen tragen die Bezeichnung "induzierbare Vorläufer osteogenetischer Zellen" (induceable osteogenetic precursor cells, IOPC). Dergleichen könnten sich vermutlich auch im Skelettgewebe befinden (OWEN 1980, BUDENZ u. BERNARD 1980). Die zweite Stammzelllinie soll sich ausschließlich im Skelettstroma befinden. Hierzu gehören das lockere Bindegewebe des Periosts, des Endosts, des Knochenmarks und der Haversschen Gefäße. Diese Stammzellenart differenziert sich spontan zu osteogenetischen Zellen. Sie ist deshalb als dazu prädestiniert anzusehen und trägt folgerichtig die Bezeichnung "determined osteogenic precursor cell, DOPC". TIBONE u. BERNARD (1982) konnten in vitro mittels aus Knochenmark gewonnenen Stammzellen Knochen erzeugen. Diese Autoren gehen davon aus, daß die von ihnen dargestellten Zellen keine Mesenchymzellen sind, und daß sie die eigentlichen predestinierten (DOPC) Zellen darstellen. Hiermit stehen sie im Widerspruch zu Owen und Friedenstein, welche die prädestinierten Zellen dem Mesenchym zuordnen.

2.5.3 Fraktur- und Osteotomieheilung

Eine Fraktur liegt vor, wenn exogene oder endogene Belastungen eine plötzliche Kontinuitätsunterbrechung verkalkter Knochenstruktur verursachen. Osteotomien werden dagegen in der Regel künstlich erzeugt. Im Falle normaler Knochenheilung laufen bei beiden Kontinuitätsunterbrechungen die gleichen histokinetischen Prozesse ab. Intensität und Charakter der folgenden histomorphologischen Ereignisse stehen in ursächlichem Zusammenhang mit dem Abstand der Fragmente, der Lokalisation des Defektes, dem Alter des Patienten, dem Blutversorgungszustand, der Interposition von Weichgewebe und einer eventuellen Infektion. Neben Leber und Epithel ist Knochen das einzige Körpergewebe, das dazu fähig ist, bei der Regeneration mit qualitätsgleichem Ersatzgewebe zu reagieren, wodurch es zu einer restitutio ad integrum kommt. Demnach entsprechen funktionell minderwertige Gewebe - fibröses Gewebe, Osteoid, Knorpel - nicht regelrecht geheiltem Knochen.

Knochenheilung vollzieht sich in zwei erkennbaren Regenerationsweisen, der primären und sekundären Knochenheilung. Primäre Heilung setzt eine ideale Reposition sowie totale Immobilisation der Fragmente voraus (SCHENCK u. WILLENEGER 1964). Bei der primären Frak-

turheilung (z. B. Druckplattenosteosynthese) werden die Bruchfragmente direkt durch Bildung lamellärer Osteone zusammengefügt. Dabei stehen allerdings die Osteone senkrecht zur langen Knochenachse (SCHENCK u. WILLENEGER 1964, STUTZMANN u. PETROVIC 1982). Kallusbildung als Übergangsphase bleibt aus.

Klinisch kommt sekundäre Heilung viel häufiger vor, da sich die anspruchsvollen Forderungen an die primäre Heilung oft nicht erfüllen lassen. Bei der sekundären Heilungsvariante entsteht Knochen nämlich mittelbar über Knorpelersatz. Dieser Entstehungsweg ist der enchondralen Ossifikation nicht unähnlich. In Anlehnung an die Heilungskinetik des Weichgewebes ordnen klassische Schilderungen das Hämatom direkt dem Knochenheilungsablauf zu. Daraus haben sich Begriffe wie "bindegewebiger Kallus" und "Prokallus" ergeben. Heute mißt man der Wucherung osteogenetischer Stammzellen, die sich in der Keimschicht des Peri- und Endosts sowie im Stroma des Knochenmarks befinden, mehr Bedeutung zu. Diese erscheinen abgeplattet bis spindelförmig, im Gegensatz zu den Osteoblasten, die plump oder gerundet gestaltet sind. Der Beitrag eines Gerinnsels zur Knochenheilung ist immer wieder mit Skepsis aufgenommen worden (KRAMER 1970). Andere Autoren sehen es geradezu als Hindernis der Konsolidierung an (HAM u. HARRIS 1971) und neuerdings wird es nicht einmal mehr erwähnt (STUTZMANN u. PETROVIC 1980, 1982; PETROVIC 1982).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bei der Fraktur- bzw. Osteotomieheilung - einschließlich der Einverleibung von in Knochen eingesetzten Implantaten - pluripotente osteogenetische Stammzellen im Mittelpunkt des Geschehens stehen (Abb. 4). Bei optimaler Adaptation und Immobilisation übernehmen Osteoblasten die Defektüberbrückung durch Osteonenbildung (SCHENCK u. WILLENEGER 1964, 1967). Die Osteoblasten entstammen dabei der Zellschicht des stratum osteogeneticum periostei et endostei, die in Kontakt mit der Knochenoberfläche stehen (HAM u. HARRIS 1971). Ist der zu überbrückende Defekt breiter als 1 mm, so greifen die osteogenetischen Stammzellen die Neubildung auf (SCHENCK u. WILLENEGER 1967). Sie befinden sich in der Kambiumschicht des Peri- sowie des Endostes, zwischen den Osteoblasten auf der einen und den Fibroblasten auf der anderen Seite (HAM u. HARRIS 1971). STUTZMANN u. PETROVIC (1980, 1982) sowie PETROVIC (1982) haben eine chronologische

Physiologie

Histologie

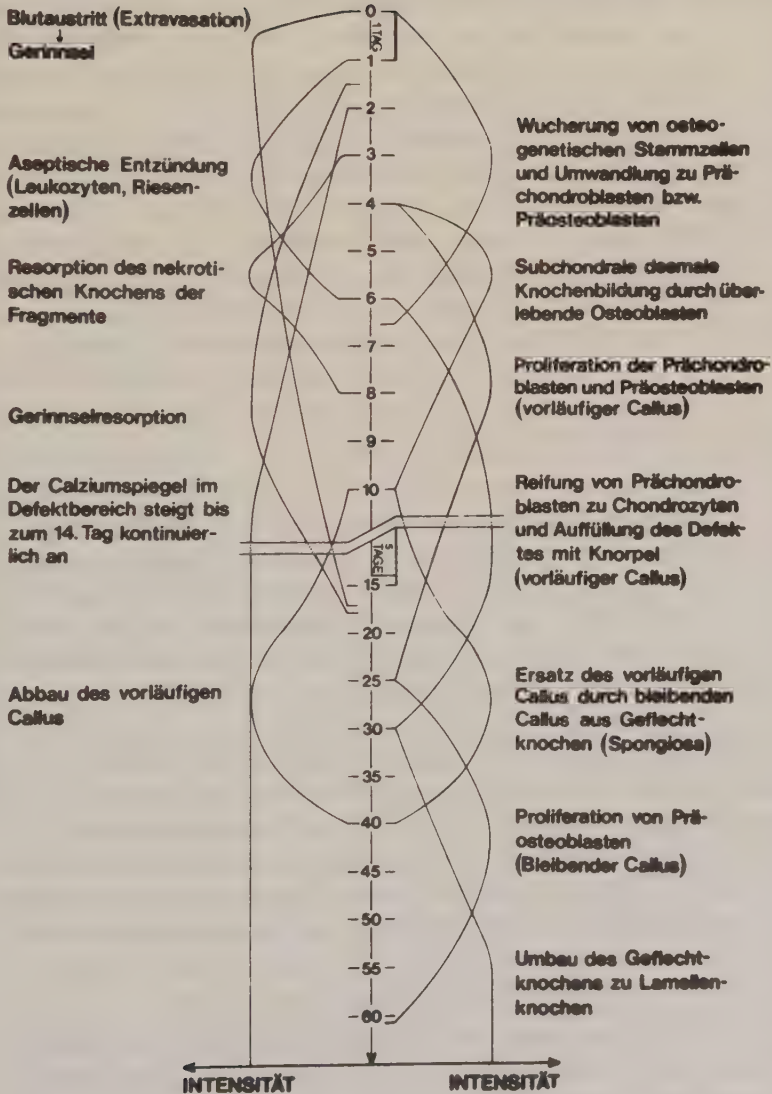


Abb. 4

Physiologie und Histologie der Fraktur- bzw. Osteotomieheilung
in Abhängigkeit von der Defektentstehung

Reihenfolge der sich dabei abspielenden histokinetischen Erscheinungen angegeben. Zwischen dem 1. und 5. Tag dominiert demnach die Wucherung von Stammzellen (Skelettoblasten). Gleichzeitig differenzieren sich die Stammzellen zu Präosteoblasten bzw. -chondrozyten. Zwischen dem 6. und 10. Tag nach Frakturereignis sollen Präosteoblasten - ähnlich den sekundären Prächondrozyten - proliferieren, bei gleichzeitiger Bildung vorläufigen Knochen- bzw. Knorpelkallus. Zwischen dem 30. und 60. Tag sollen ausschließlich Präosteoblasten unter Bildung bleibenden Kallus proliferieren. In Abb. 4 sind die in der Literatur geschilderten physiologischen und histomorphogenetischen Abläufe zusammengestellt. Mit zunehmendem Alter soll die Population der Stammzellen absinken. Bei 70 Jahre alten Patienten wurde eine verlangsamte Umwandlung von Stammzellen in Präosteoblasten beobachtet (STUTZMANN u. PETROVIC 1982). Die Autoren sehen dabei einen möglichen kausalen Zusammenhang mit der bekannten Problematik der Frakturheilung im Alter.

Im Frakturbereich soll aufgrund beeinträchtigter Blutversorgung und des entstandenen Hämatoms das pH vom physiologischen Wert (7,4) bis auf 5,2 in der ersten Woche nach dem Trauma absinken (BECHTOL et al. 1959). Die Werte normalisieren sich erst gegen Ende der zweiten Woche. Wird diese pH-Verschiebung in den sauren Bereich auch für Osteotomien angenommen, so dürfte das ebenfalls Einflüsse auf in Knochen eingebrachte Implantate haben.

2.5.4 Lokale Faktoren und Mechanismen der Knocheninduktion

Knochenwachstum ist das Resultat einer Wechselwirkung zwischen genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen (VAN LIMBORGH 1982, HOYTE 1982). Auch lokale Faktoren und Mechanismen der Knocheninduktion sind diesen allgemeinen und regionalen Regelungen unterworfen. Lokale Knochenherzeugung ist im Zuge des Knochenersatzes derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Dabei stehen Knochenmatrix und elektrischer Strom im Vordergrund.

Systematische histologische Untersuchungen an autologen Trans- und Implantaten wurden schon um die Jahrhundertwende von BARTH (1893, 1894, 1895) durchgeführt. Barth sah diese biologischen Ersatzmaterialien als gleichwertig an und schrieb ihren Erfolg einem "schleichenden Ersatz" zu. Spätere Untersuchungen stellten

die Bedeutung der im Transplantat überlebenden Osteoblasten (HAM u. GORDON 1952, RAY u. SABET 1963, BASSET 1972) und den osteoinduktiven Einfluß des Implantates auf das Lagergewebe (RAY u. SABET 1963) heraus.

URIST (1965) konnte zeigen, daß entmineralisierter Knochen auch ektopisch (im Nicht-Skelettgewebe) Knochensubstanz und -mark erzeugen kann. YEOMANS u. URIST (1967) sowie BANG (1972, 1973) wiesen das gleiche Phänomen durch entmineralisiertes Dentin nach. MULLIKEN u. GLOWACKI (1975) sowie KABAN et al. (1979) verwandten sowohl entmineralisierten Knochen als auch entmineralisiertes Knochenpulver bei Ratten, um Knochen im Gesichtsbereich zu erzeugen. Demineralisierter allogener Knochen und dessen Pulver fanden in der Folgezeit bei GLOWACKI et al. (1981 a, 1981 b) und KABAN et al. (1982) klinische Anwendung.

URIST et al. führten die osteomorphogenetische Potenz entmineralisierten Knochens, Dentins und Zahnschmelzes auf ein darin enthaltenes nicht-kollagenes Protein zurück (URIST u. STRATES 1971, URIST u. IWATA 1973). Nach knapp zwanzig Jahren mühsamer Extrahierungsversuche (MIZUTANI u. URIST 1982) ist es gelungen, ein sog. "osteomorphogenetisches Protein" (bone morphogenetic protein, BMP) weitgehend zu isolieren (URIST et al. 1982). Es stellt ein hydrophobes Glykoprotein dar und läßt sich auch aus Osteosarkom-Gewebe isolieren. Bei Implantation zieht es Mesenchym-Stammzellen an, die dann auf eine immer noch ungeklärte Weise von ihrer Differenzierungsbahn zur osteogenetischen Linie abgelenkt werden. Das Glykoprotein findet klinische Anwendung (URIST 1980) und ist im Handel unter der Bezeichnung "Tripple A bone" (DIEWERT 1982) erhältlich. Darüber hinaus werden in der Literatur unterschiedlich bezeichnete Polypeptide aus Knochenmatrix angegeben, die experimentell Knochen induzieren (MOHAN et al. 1984). Dazu gehören auch Osteocalcin sowie Osteopoetin (AMLER u. GOLD 1980).

Wird Knochen belastet, so entsteht durch die hervorgerufene Deformation ein Polarisationsmuster. Dieses elektrische Phänomen trägt die Bezeichnung "belastungsbedingtes Potential" (stress generated potential, SGP) oder Piezoelektrizität. Zugbelastete Stellen tragen dabei ein positives und Kompressionsbereiche ein negatives Vorzeichen. Piezoelektrizität und Knochenumbau gehören

zusammen (COCHRAN et al. 1967, BASSETT 1971, BASSETT u. PAWLUK 1975, DAVIDOVITCH et al. 1980). Die osteogenetische Potenz ließ sich auch für exogenen Strom - Stromstärke 5 - 20 μ amp. (FRIEDENBERG et al. 1970) - am intakten Knochen nachweisen (BASSETT et al. 1964). Experimentelle und klinische Ergebnisse an heilendem Knochen (LAVINE et al. 1972, YASUDA 1974, BRIGHTON et al. 1975, 1977; BECKER et al. 1977) haben dazu geführt, daß die Food and Drug Administration (USA) zur Behandlung schlecht heilender Frakturen drei Anwendungsbereiche exogenen Stroms zugelassen hat (PECK et al. 1984).

2.5.5. Theorien der Apatitfällung

Hierbei handelt es sich um physikalisch-chemische Modelle, die den Verkalkungsablauf zu erklären versuchen. Verkalkung faßt man als einen Vorgang auf, wodurch in Lösung enthaltene anorganische Ionen bzw. -komplexe innerhalb einer organischen Matrix zu einer Festkörperphase (solidus) ausfallen. Dabei kann die Ausfällung mit einer chemischen Reaktion verglichen werden. An sich ist sie jedoch nur eine Umwandlung des Aggregatzustandes wie H_2O (liquidus) $\longrightarrow$ H_2O (solidus) (GLIMCHER 1959, 1976). Den Verkalkungsprozeß teilt GLIMCHER (1976) in 4 Stufen ein:

- 1) Das Anbahnen und die Bildung allererster Partikel der Festkörperphase (Anfangskeimbildung, primäre Keimbildung):
- 2) Nachträgliches Wachstum der Festkörperpartikel (sind die Partikel der Anfangsfestkörperphase kristallin, so spricht man von Kristallwachstum).
- 3) Unter Umständen nachfolgende Bildung zusätzlicher Festkörperpartikel (sekundäre Keimbildung) und ihr Wachstum.
- 4) Spätere zeitabhängige Umwandlung der Anfangsfestkörperphase durch in situ Festkörper-Reaktionen oder durch Auflösung der Anfangsphase und erneute Kristallisierung.

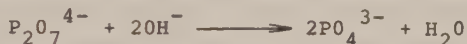
Jede Theorie sollte das folgende Verhalten des Knochenminerals erklären können:

- a) Neugebildetes Knochenmineral weist ein niedriges Ca/P-Molar-Verhältnis auf, das sich jedoch mit der Knochenreifung erhöht.
- b) Im Knochenmineral liegt stark adsorbiertes Wasser vor.
- c) Wird Knochenmineral hoch erhitzt, so wandelt sich ein Teil in

Pyrophosphat ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) um. Das deutet auf das Vorhandensein von OCP - $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4$ - hin. Reiner HA bildet nämlich unter Calcinieren kein Pyrophosphat. Defektapatit (Tricalciumphosphathydrat) - $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ - bildet zwar bei 600°C durch



Pyrophosphat, das jedoch zwischen $600 - 700^\circ$ durch



wieder verschwindet (DALLEMAGNE u. RICHELLE 1973). Demnach besitzt OCP keine OH-Gruppen, weshalb das gebildete Pyrophosphat weiterbesteht.

- d) Infolge der heterogenen Natur des Knochenminerals ändern sich seine chemische Zusammensetzung und sein Wassergehalt - bezogen auf Ort und Zeit -.
- e) Die Kristallinität steigt mit dem Alter bis auf 70 - 80 % an. Mikroskopisch lagern sich in einem Osteon zunächst rasch 60 - 70 % der am Ende schließlich vorhandenen Gesamtmineralmasse (Primäre Mineralisierung) ab. Die übrigen 30 - 40 % fallen dann langsam über weitere 6 - 7 Wochen (Sekundäre Mineralisierung) aus.

Die interstitiellen Flüssigkeiten sind bezüglich der Calcium- und Phosphationen metastabil eingestellt (s. 2.5). Daraus ergibt sich, daß ein Mechanismus, der das örtliche Ionenprodukt $[\text{Ca}^{2+}][\text{P}_i]$ bis zum kritischen Wert von 6mM^2 erhöht, prinzipiell Apatitfällung verursachen kann. Diese Abläufe werden in der Verkalkungsliteratur "homogene", "spontane", bzw. "booster"-Mechanismen genannt.

Eine weitere Möglichkeit kann auf dem Vorhandensein eines Katalysators beruhen. Es wird angenommen, daß in verkalkender Matrix Makromoleküle vorhanden sind, welche die Energie-Barriere zur Verkalkung überwinden und dadurch den Verkalkungsvorgang triggern. Bei dieser katalytischen Verkalkung - auch heterogen bezeichnet - soll die Fällung dadurch gefördert werden, daß Makromoleküle den Ca^{2+} - und P_i -Ionen Nukleationsloci liefern. Es liegt in der Natur eines metastabilen Systems, daß ein einmal angefangener Umwandlungsvorgang galoppierend und ubiquitär fortschreitet. Deshalb

werden Verkalkungshemmer postuliert, welche den Mineralisierungsprozeß dadurch regulieren, daß sie in Keimbildung oder Kristallwachstum eingreifen (WILLIAMS u. SALLIS 1982). Dadurch ist erklärbar, warum z. B. bei Skelettieren nicht der ganze Körper der Mineralisierung anheimfällt (NEUMAN 1980).

Die Erklärung des Verkalkungsvorganges scheitert nicht daran, daß entsprechende Matrix-Komponenten nicht angetroffen würden. Eine ganze Reihe von möglicherweise beteiligten Katalysatoren bzw. Inhibitoren ist diskutiert worden (URIST 1976, LUBEN et al. 1973, GLIMCHER 1976, NEUMAN 1980, BOSKEY 1981, WILLIAM u. SALLIS 1982). Die Schwierigkeiten bei den Erklärungen des Verkalkungsprozesses scheinen vielmehr in der Festlegung tatsächlich beteiligter Komponenten sowie der temporalen und räumlichen Reihenfolge ihrer Wirkungen zu bestehen.

Die Elementarzelle des Hydroxylapatites - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - hat 18 Ionen. Es fehlt an physikalisch-chemischen Modellen, um erklären zu können, wie diese Vielzahl an Ionen zusammentreten kann, um so HA de novo zu bilden (NEUMAN 1980). Es wird angenommen, daß es sich bei der Anfangsausfällung um einfachere Calciumphosphat-Niederschläge handelt, die nachträglich durch einen *in situ* Umwandlungsprozeß in HA-ähnliche Mineralphasen übergehen (WALTON 1967). Diesbezüglich sind die Octacalciumphosphat (OCP)- und die Amorph-Calciumphosphat (ACP)-Theorien verbreitet.

Die OCP-Theorie nimmt an, daß sich zunächst kristallines OCP - $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4).5\text{H}_2\text{O}$ - niederschlägt, welches dann *in situ* durch eine Festkörperreaktion in HA übergeht. In der Literatur sind sporadische Berichte zu finden, die aufgrund von Röntgenbeugungsergebnissen (HAYEK 1967, MÜNZBERG 1970), Solubilitätsverhalten (BROWN et al. 1979, THOMSON u. NANCOLLAS 1978) sowie morphologischen Beobachtungen (BOCCIARELLI 1970) auf das Vorhandensein von OCP in Knochen bzw. Zahnschmelze hindeuten. Nach WALTON (1967) liegen bei der Fällung immer Nukleationskeime mit Durchmesser von 5-20 Å vor. Bei der Phasenveränderung $\text{Ca}^{2+}_{(l)} + \text{P}_{i(l)} \longrightarrow \text{CaPO}_{4(s)}$ wird der Durchmesser zuerst analytisch erfassbarer Partikel auf 9,5 Å festgelegt (POSNER et al 1983). Die Elementarzellenparameter des hexagonalen HA bewegen sich um $a=b=9,42\text{Å}$; $c=6,88\text{Å}$. Die des Monoklin-OCP liegen um $a^*=19,87\text{Å}$, $b^*=9,63\text{Å}$, $c^*=6,87\text{Å}$. Das besagt, daß annähernd $2a=a^*$, $b=b^*$, $c=c^*$ gilt.

Darin fanden BROWN (1966, 1979) und BROWN et al. (1979) einen weiteren Grund zur Annahme, daß sich Knochenmineral zuerst als OCP anlagert. Einen reproduzierbaren Beweis für das Vorhandensein des OCP in Knochen und Zahnschmelze gibt es jedoch bisher nicht. Es bestehen sogar Meinungen, die jegliche Beteiligung des OCP streng ablehnen (GLIMCHER 1968, GRYPAS et al. 1984).

Die ACP-Theorie geht davon aus, daß es zuerst zum Niederschlag von Calciumphosphat-Verbindungen kommt, die sich bei der Röntgen-Analyse als amorph darstellen. Danach lösen sich die amorphen Verbindungen auf, um sich dann durch erneute Nukleation niederzuschlagen. Die Existenz von ACP als Vorläufer des im Knochen befindlichen Defektopatites wurde zunächst angenommen, um die niedrigeren Röntgenbeugungsintensitäten des Knochenminerals gegenüber dem synthetischen Defektopatit erklären zu können (EANES et al. 1966, TERMINE u. POSNER 1967). Darüber hinaus ließ sich ACP als intermediäre Festkörperphase bei *in vitro* Fällung von HA aus übersättigten Calciumphosphatlösungen feststellen (EANES et al. 1965). Außerdem war bereits von ROBINSON u. WATSON (1955), MOLNER (1959) sowie von HÖHLING et al (1966) auf nichtkristalline Mineralaggregate im Knochen hingewiesen worden. Zunächst wurde der ACP-Gehalt auf 60 - 70 % festgelegt (TERMINE u. POSNER 1967). Bei nachträglichen Untersuchungen hat der ACP-Gehalt eine drastische Revision nach unten erfahren (TERMINE u. EANES 1972, TERMINE et al. 1973, GLIMCHER et al. 1981). Nach heutiger Ansicht soll das im Knochen vorhandene ACP die 10 %-Grenze nicht überschreiten. Es besteht sogar die Möglichkeit, daß es überhaupt nicht vorliegt (GRYPAS et al. 1983, 1984).

Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) wird derzeit als möglicher Vorläufer des Knochenminerals diskutiert (NEUMAN et al. 1982).

3 Eigene Untersuchungen

Bei den sog. bioaktiven Werkstoffen soll es nach der Implantation in den Knochen unter günstigen Voraussetzungen zu einem direkten Verbund des alloplastischen Materials mit dem Lagergewebe kommen (2.3). Die Art dieses Verbundes - ob physikalisch, chemisch oder rein mechanisch - ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht eindeutig abgeklärt. Während biotolerante und bioinerte Implantate

immer bindegewebig eingeschieden werden - gleich in welche Gewebe sie eingebracht wurden - sollen Glaskeramiken, Biogläser und Calciumphosphatkeramiken bioaktive Eigenschaften aufweisen.

Aufgabe dieser Arbeit war es nun, nähere Aufschlüsse über die Art des Verbundes Knochen - Hydroxylapatit zu erhalten. Da die chemischen, physikalischen und elektroenergetischen Eigenschaften des Implantatmaterials darüber entscheiden, ob, wie und welche Zellen an der nicht biologischen Festkörperoberfläche Anschluß finden werden, ist zunächst der Werkstoff zu charakterisieren.

3.1 Morphologische Eigenschaften und chemische Zusammensetzung des Implantatwerkstoffes

Das Ausgangspulver für die Erzeugung der in dieser Arbeit untersuchten HA-Implantate wird nach dem Fällungsverfahren gewonnen (2.4.2C). Da von seinem Hersteller keine Angaben zur Größe und Morphologie der Körner in der Ausgangssubstanz gemacht werden und mit der Firmenbezeichnung "Tricalciumphosphatpulver Merck" auch Unklarheiten bezüglich der chemischen Zusammensetzung bestehen bleiben (2.3.2), galt es zunächst, entsprechende Parameter zu bestimmen.

3.1.1 Rasterelektronenmikroskopie am Ausgangspulver

Hierzu wurde das Pulver unter Vermeidung jeder Kontamination im Anlieferungszustand dünnsschichtig auf einen Aluminiumobjektträger aufgebracht. Dann erfolgte, um ein besseres Anhaften der Substanz auf der Unterlage zu erreichen, das Betropfen mit Äther bis zur gleichmäßigen Durchfeuchtung. Lufttrocknung und anschließende Bedampfung mit Gold bis zu einer Schichtdicke von 300 Å schlossen sich an.

3.1.1.1 Geräte

Als Bedampfungsanlage diente der "Polaron E 5000 Sputter Coater". Pro eingegebenem Impuls werden bei dem Gerät 150 Å Gold aufgebracht, so daß sich eine Aufdampfschichtdickenbestimmung erübrigt. Das verwandte Rasterelektronenmikroskop "Hitachi S-800" ist ein Niederspannungs-REM (low-voltage SEM with field emission cathode) mit einem Auflösungsvermögen von besser als 100 Å. Mit diesem REM ist bei niedriger Beschleunigungsspannung die Untersuchung

auch nicht bedampfter Proben möglich, da keine Aufladungsartefakte auftreten. Wegen der niedrigen Spannung (ca 5 kV) läßt jedoch das Auflösungsvermögen bei 20000 - 30000facher Vergrößerung nach. Deshalb wurden grundsätzlich alle Proben bedampft, um das Auflösungsvermögen des Gerätes maximal auszunutzen.

3.1.1.2 Befunde

Beim Bestimmen der Korngröße des Ausgangspulvers (Merck) im REM ergaben sich mittlere Kristallitdurchmesser von 100 - 300 Å. Die sphäritischen Gebilde waren teilweise verklumpt, so daß sie nicht getrennt zur Darstellung kamen (Abb. 5 u. 6). In der Mitte der Abb. 6 stellt sich ein nadelförmiger Kristallit mit einer Länge von 1500 Å dar. Die Dimensionsbestimmung wurde bei einer Vergrößerung von 70 000 x vorgenommen. Die Unschärfenbereiche auf den Abb. 5 und 6 zeigen, daß hierbei auch das Auflösungsvermögen des Hochleistungs-REM nachläßt.



Abb. 5

"Tricalciumphosphatpulver"

Merck

REM - Aufnahme

x 70 000



Abb. 6

"Tricalciumphosphatpulver"

Merck mit einem nadelförmigen Kristalliten

REM-Aufnahme

x 70 000

3.1.2 Rasterelektronenmikroskopie an den Sinterprodukten

Durch Erhitzen des Ausgangspulvers auf 2/3 bis 3/4 der Schmelztemperatur entstehen die Sinterkörper (2.4.2). Da die HA-Keramikblöcke vor der Implantation im Tierversuch einer Formgebung unterzogen werden mußten, erschien es sinnvoll, die REM-Untersuchungen ebenfalls an entsprechend bearbeiteten Proben durchzuführen. Die HA-Keramikblöcke (Hersteller: Heyl Chemisch-pharmazeutische Fabrik, Berlin 37) hatten die Dimensionen 45 x 15 x 10 mm. Laut Herstellerangaben bestehen die Blöcke aus Pentacalciumtriphosphat mit 1 % Mikroporen ($\varnothing$ 0,5 - 1,5 μ m) und 30 - 35 % Makroporen ($\varnothing$ 100 - 1000 μ m).

Die Blöcke wurden mit Hilfe einer halbautomatischen Drehsäge in Scheibchen der Größe 45 x 3 - 7 x 10 mm zerlegt. Dabei erfolgte das Durchtrennen mit Diamant-Trennscheiben bei niedriger Tourenzahl (500 Umdrehungen/Min). Um thermische Einflüsse auf den Werkstoff auch weiter auszuschalten, wurde die Probe nur mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 3 mm/Min an die Trennscheibe herangeführt.

Die Implantate wurden dann in entmineralisiertem Wasser mit Ultraschall über 3 - 6 Min gereinigt und luftgetrocknet. Wie im Tierversuch wurden die Proben für REM-Untersuchungen ebenfalls durch Dampf im Autoklaven sterilisiert (45 Min bei 134° C).

3.1.2.1 Geräte

Drehsäge: Präzisionstrennmaschine Accutom (Fa. Streurs) mit regulierbarer Tourenzahl. Sie besitzt eine Probenbühne, welche auf die Trennscheibe zubewegt wird. Auch diese Förderung ist regulierbar und vorher einstellbar.

REM: siehe 3.1.1.1

Ultraschallgerät: Ultramatic 150

3.1.2.2 Befunde

Die Abb. 7 - 9 zeigen den Implantatwerkstoff bei 1700 - 30 000facher Vergrößerung. Auf Abb. 7 kommen Mikroporositäten zur Darstellung. Die von den diamantierten Trennscheiben herrührenden Schleifspuren sind auf den Oberflächen immer erkennbar.

Abb. 7

HA-Keramik Schnittfläche
unbearbeitet mit Mikro-
poren (oben), Werkzeug-
spuren und Abriebpartikeln
REM-Aufnahme

x 1700



Insbesondere in den Abb. 8 und 9 kommen Einrisse zur Darstellung, die auf den Bearbeitungsprozeß des spröden Materials zurückzuführen sind und entlang der Korngrenzen verlaufen dürften. Die hellen aufgelagerten Partikel zeigen an, daß es durch die Ultraschallreinigung nicht gelungen ist, allen Abrieb von dem porösen Material vollständig zu entfernen.

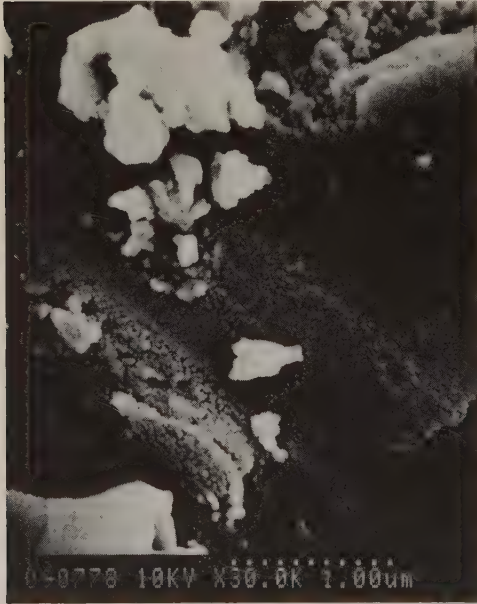


Abb. 8

HA-Keramik Schnittfläche unbearbeitet mit eingelagerter Inhomogenität (rechts oben), Werkzeugspuren und aufgelagerten Partikeln (hell)

REM-Aufnahme

x 30 000

Die körnigen Aufrauungsbereiche in den Abb. 8 und 9, welche zwischen den Schleifspuren gelegen sind, sind schwer zu interpretieren. Sie deuten auf Inhomogenitäten im Korn bzw. im Korngrenzbereich hin. Hierzu gibt der Hersteller an, daß die Keramik zu 85 % aus reinem HA (Mol.Gew. 502,32) und zu maximal 15 % aus begleitendem β -TCP (Mol.Gew. 310,19) besteht. Demnach können die Inhomogenitäten auf eine andere Phase hindeuten. Um dieser Frage weiter nachzugehen, haben wir uns an das Institut für Werkstoffwissenschaften der Universität Erlangen - Nürnberg gewandt. Dort wurde (Dr. Bauer) aus dem gleichen Merck-Pulver, das auch die Firma Heyl verwendet, Hydroxylapatit-Keramik bei relativ hohen Temperaturen gesintert. Im Gegensatz zu den eigenen Präparaten, bei denen keine Gefügepräparation erfolgte, wurde bei den

Abb. 10 und 11 thermisches Ätzen durchgeführt.



Abb. 9

HA-Keramik Schnittfläche unbearbeitet mit eingelagerter anderer Phase (Rauheitsbereich), Werkzeugspuren, eingelagerten Partikeln (hell) und Einrissen

REM-Aufnahme

x 30 000

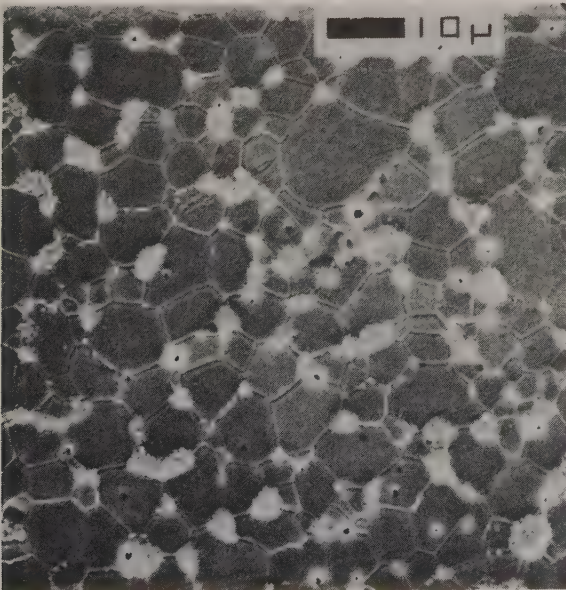


Abb. 10

Gefügebild HA-Keramik mit an den Korngrenzen eingelagerter zweiter Phase und Mikroporen

Fremdaufnahme thermisch geätzt

REM-Aufnahme

x 1500

Hier ist die jeweils an den Korngrenzen eingelagerte andere Phase gut erkennbar. Aufgrund der chemischen Zusammensetzung des Werkstoffes ist diese als Tricalciumphosphat zu deuten. Die sphärische Form der Kristallite in diesen Bereichen glaubt man insbesondere in der Abb. 9 wiederzuerkennen. Nur sind sie hier bedingt durch den Bearbeitungsprozeß entrundet. Auch die Lokalisation der anderen Phase in der Abb. 9 scheint mit den Abb. 10 und 11 übereinzustimmen. Hier stoßen drei Korngrenzen aufeinander und der Aufrauhungsbereich ist dazwischen postiert.

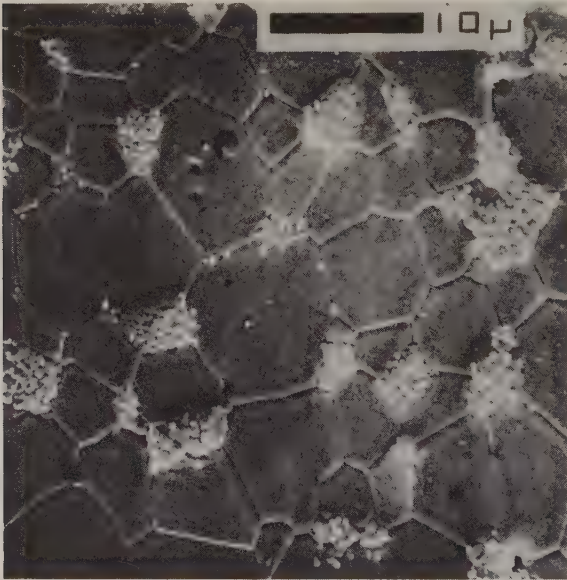


Abb. 11
Gefügebild
HA-Keramik mit
anderer Phase und
vereinzelten Mikro-
poren thermisch
geätzt
REM-Fremdaufnahme
x 2900

Sicherlich wäre es wünschenswert, die eingelagerte Phase mikroanalytisch genau zu charakterisieren. Hierzu muß jedoch festgestellt werden, daß bei den 1 - 3 μm großen Bereichen die HA-Umgebung naturgemäß in das Meßergebnis mit eingehen würde. Fest steht, daß der Inhomogenitätsbereich der Abb. 9 ebenfalls 1 - 3 μm im Durchmesser mißt. Daß die zweite Phase nicht immer und überall vorkommen muß, ist an den Abb. 12 und 13 ersichtlich. Die Aufnahme stammt aus dem Boden einer freiliegenden Pore. Hier stoßen die Korngrenzen jeweils ohne Interponat aufeinander und sind ungestört.

Abb. 12

Gefüge von HA-Keramik am
Boden einer Pore mit Kristall-
wachstumslinien und aufge-
lagerten Abriebpartikeln
(hell)

Oberfläche unbearbeitet
REM-Aufnahme

x 4000

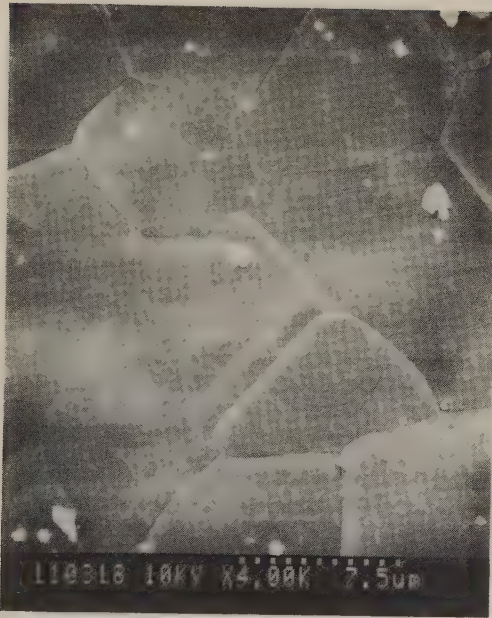


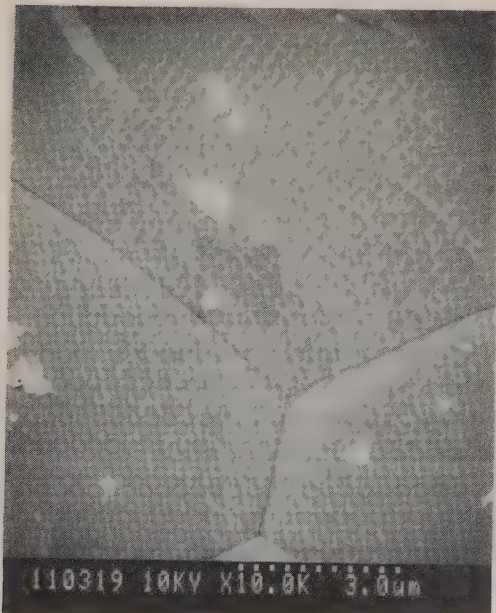
Abb. 13

Gefüge von HA-Keramik wie
in Abb. 12

Die Korngrenzen sind un-
gestört

REM-Aufnahme

x 10 000



Aufgelagerte Abriebpartikel (hell) und Kristallwachstumslinien sind gut erkennbar. Die ungestörten Korngrenzen lassen auf gute Herstellungsbedingungen des Werkstoffes schließen. Auf die grundsätzlichen Schwierigkeiten beim Fertigen gleicher und gleichwertiger Calciumphosphate wurde unter 2.3.2 verwiesen. Bei Sintern gehen durch Kristallwachstum die 100 - 300 Å großen Kristallite der Ausgangsprodukte in hexagonale Mikrokristalle über. Die Mikrokristalle haben je nach Orientierung und Höhe der Schnittebene einen Durchmesser von 2 - 16 µm (Mitte 5 - 8 µm).

3.1.3 Röntgendiffraktometrische Untersuchungen am Implantatmaterial

Zur Überprüfung der Herstellerangaben bezüglich der chemischen Zusammensetzung des Implantatwerkstoffes wurde eine Stückanalyse an einem dichtgesinterten HA-Zahnwurzel-Implantat Heyl[®] der Größe C durchgeführt. Dieses wurde zunächst in einem Achatmörser bis zu Partikelgrößen von 1 - 5 µm fein zermahlen. Das so entstandene Pulver konnte mittels Aceton auf einer Membran fixiert werden. Die Analyse wurde an einem Guinier-Röntgendiffraktometer durchgeführt und mit einem Computer ausgewertet (JOBST u. GÖBEL 1982, GÖBEL 1985). Die Probe bewegte sich in 2ϑ -Schritten von jeweils $0,020^\circ$ vom Beugungswinkel $2\vartheta = 8,00^\circ$ bis $2\vartheta = 48,00^\circ$ (Abszisse Abb. 14). So konnten 2000 2ϑ -Punkte erfaßt werden (Abb. 14).

3.1.3.1 Gerät

Pulver-Röntgendiffraktometer "Siemens D 500". Die Kurve der gemessenen Reflexe erscheint hierbei an einem Graphik-Bildschirm mit Standard-Vergleichsdaten als Strichdiagramm (Abb. 14 unten). Dadurch ist eine eindeutige Zuordnung der gemessenen Impulse zur entsprechenden chemischen Verbindung möglich. Für die semiquantitative Bestimmung der Zusammensetzung werden die gemessenen Intensitäten mit Hilfe standardisierter Vergleichsfaktoren (Korundfaktor) normalisiert. Dadurch wird der unterschiedlichen "Streukraft" verschiedener Kristallgitter Rechnung getragen. Sämtliche dieser Daten sind in der vom Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) herausgegebenen Standarddatei (1972) enthalten.

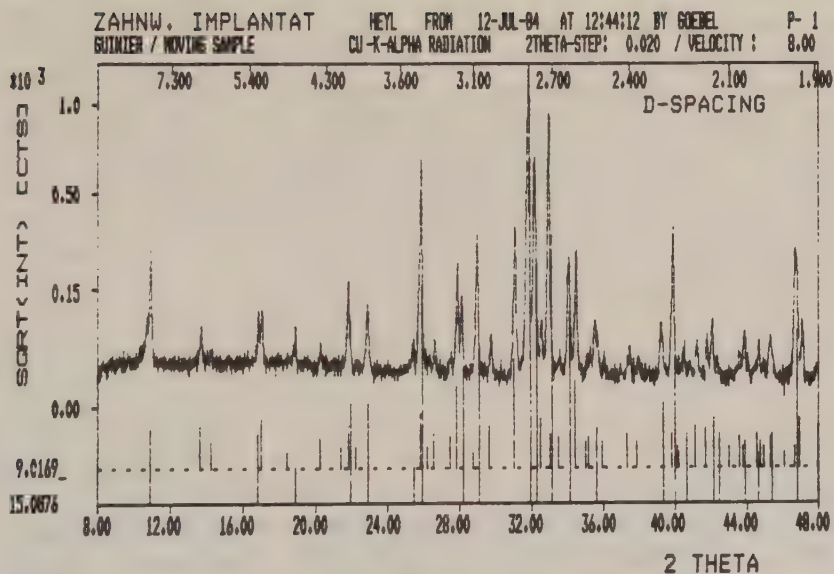


Abb. 14

Röntgendiffraktogramm eines pulverisierten Zahnwurzelimplantates. Der Zusammenhang zwischen Beugungsreflexen (als Wurzel der Intensität), Glanzwinkel (2ϑ) und Netzebenenabstand (d-spacing) ist dargestellt. Die Beugungsmaxima weisen auf HA und Begleit- β -TCP hin

3.1.3.2 Befunde

Abb. 14 gibt das Pulver-Röntgendiffraktogramm wieder. Hier ist die Beziehung zwischen Intensität, Beugungswinkel (2ϑ) und Netzebenenabstand - d-spacing - ($\text{\AA}$) dargestellt. Die Balkendarstellungen (unten) geben die Herkunft der jeweiligen Beugungsmaxima der oberen Kurve an. Sie spiegeln Abmessungen und Struktur der Elementarzellen wider. Die Linien sind der Darstellungsklarheit halber von der Intensitätsachse nach unten gerückt. Die unterbrochene Achse (9.0169) gehört zum β -TCP und die ununterbrochene (15.0876) zum HA. Hier tritt zutage, daß dem zur Hauptsache aus HA bestehenden Analysestück β -TCP beigemischt ist. Die Darstellung stimmt mit

den Angaben der JCPDS-Karten (Abb. 15, 16 u. 17) überein.

Abb. 15

JCPDS-Karte
 $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$ des
 Joint Committee
 on Powder Diffraction
 Standards
 (1972)

15-876 MINOR CORRECTION

d	2.80	2.70	2.77	8.12	Ca ₅ F(PO ₄) ₃
I/I ₁	100	60	55	8	Calcium Fluoride Phosphate (Fluorapatite)
Rad. CuKα ₁	λ 1.5405	Filter Ni	Dis		
Cut off	50	1/1 ₁ Diffractometer			
Ref. Natl. Bur. Stds. (U.S.) Mono. 25, Sec. 3 27 (1964)					
Syn. Hexagonal		S.G. P6 ₃ /m (176)			
a 9.3684 Å		c 6.8841 Å			(ρ 3.7482)
Ref. Ibid.		ρ 0.8841 g/cm ³			z 2 D ₂ 3.201
α 1.628	n _D 1.635	n _F	α _D	Sign	
2θ	D	mp	Color	Colorless	
Ref. Ibid.					
Prepared at NBS from CaF ₂ and Ca ₃ (PO ₄) ₂					
Spec. anal.: 0.1 to 1.0% each of Mg and Na; and 0.01 to 0.1% each of Al, Ba, Ge, Fe, Si, and Sr.					
Pattern was made at 25°C.					

d Å	I/I ₁	hkl	d Å	I/I ₁	hkl
8.12	8	100	2.028	2	400
5.75	4	101	1.997	4	203
4.684	<1	110	1.937	25	222
4.055	8	200	1.884	14	312
3.872	8	111	1.862	4	320
3.494	<1	201	1.837	30	213
3.442	40	002	1.797	18	321
3.167	14	102	1.771	14	410
3.067	18	210	1.748	14	402
2.900	100	211	1.722	16	004
2.772	55	112	1.684	<1	104
2.702	60	300	1.637	6	322
2.624	30	202	1.607	4	313
2.517	6	301	1.580	2	501
2.289	8	212	1.562	<1	303
2.250	20	310	1.534	6	420
2.218	4	221	1.524	4	531
2.140	6	311	1.501	4	214
2.128	4	302	1.497	4	421
2.061	6	113	Plus 40 lines to .99		

© Joint Committee on Powder Diffraction Standards 1972

Abb. 16

JCPDS-Karte
 $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ des
 Joint Committee
 on Powder Diffraction
 Standards
 (1972)

9-169 MAJOR CORRECTION

d

2.50

2.61

3.21

8.15

β-Ca₃(PO₄)₂

BETA CALCIUM ORTHOPHOSPHATE

(WHITLOCKITE)

1/I₁

100

65

55

12

d Å

1/I₁

hkl

d Å

1/I₁

hkl

Rad. CuKα₁ λ 1.5405

Filter

Dis. 114.6mm

Cut off 50

1/I₁ PHOTOMETER

Ref. DEBOLFF, TECHN. PHYS. DIEMT, DELFT, HOLLAND

Syn. Hexagonal

S.G. R3c (167)

a 10.43 Å

a₀ 37.26 Å

c 6.8 Å

z 21

D₁₀ 3.67

Ref. 1918. SPAGE GROUP AND Z FROM ISOMORPHOUS WHITLOCKITE

α 2θ

D

n_D

n_F

Color

Sign

Sample OBTAINED BY HEATING A COMMERCIAL SAMPLE

8.15

12

012

2.607

65

280

6.49

16

104

2.562

8

011.14

6.22

6

005

2.553

8

222

5.21

20

110

2.520

12

211.10

4.90

2

113

2.498

6

131

4.28

4

202

2.407

10

1.21.288

4.15

4

016

2.375

6

315

4.08

16

024

2.363

10

1.0.16

4.00

4

116

2.249

8

1.1.15

3.45

25

1.0.10

2.241

2

042

3.40

4

211

2.195

14

404

3.36

10

122

2.165

12

3.0.12

3.25

6

107.200

2.109

4

1.2.14

3.21

55

214

2.074

3

0.2.14

3.11

2

0.0.12.125

2.063

4

321

3.01

16

300

2.061

6

232

2.940

100

2.2.10.217

2.033

10

046

2.757

20

128

2.023

6

324

2.710

10

306

2.017

4

3.1.11

2.674

6

1.1.12

SEC / Q LUG 40 CARD

Abb. 17

JCPDS-Karte
 $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ des
 Joint Committee
 on Powder Diffraction
 Standards
 (1972)

9-169 MAJOR CORRECTION

d	2.50	2.61	3.21	8.15	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	BETA CALCIUM ORTHOPHOSPHATE	(WHITLOCKITE)			
I/I ₁	100	65	55	12						
Rad. CuKα ₁	λ	Filter	Dis.		d Å	I/I ₁	hkl	d Å	I/I ₁	hkl
Cut off	50	1/I ₁ PHOTOMETER			2.000	8	2.2.12	1.600	4	
Ref. DEBOLFF, TECHN. PHYS. DIEMT, DELFT, HOLLAND					1.970	2	410	1.552	12	
					1.946	4	413	1.532	4	
					1.933	20	3.0.10.327	1.520	4	
Syn. Hexagonal		S.G. R3c (167)			1.895	16	236	1.505	4	
a 10.43 Å	a ₀	a ₀ 37.26 Å			1.879	14	416	1.465	6	
c 6.8 Å	z	z 21			1.830	12	(0.1.20)	1.440	4	
Ref.							(3.1.14)	1.423	4	
					1.812	6	3.2.10	1.414	4	
α 2θ	D	n _D	n _F	Color	Sign	1.798	8	502	1.409	6
Ref						1.781	8	419	1.387	4
						1.774	8	054		
						1.738	8	330		
						1.728	25	2.0.20		
						1.711	6			
						1.685	8			
						1.665	4			
						1.637	6			
						1.625	8			
						1.603	6			

SEE PRECEDING CARD

SEE PRECEDING CARD

Die Intensität auf Abb. 14 ist als Funktion ihrer Wurzel dargestellt. Durch die nichtlineare Darstellung bleiben die schwachen Reflexe noch sichtbar, ohne daß die starken abgeschnitten werden müssen. Die scharfen Beugungsmaxima (Peaks) lassen auf hohe Kristallinität des Analysestückes schließen. Die Computer-Auswertung ergab, daß sich das Analysestück zu ca. 20 % aus β -TCP und ca. 80 % aus Hydroxylapatit zusammensetzt. Damit findet die Interpretation der in Abb. 8 - 11 dargestellten zweiten Phase ihre Bestätigung.

3.2 Tierversuche

Zum Studium des zeitlichen Ablaufs der sichtbaren biologischen Reaktion des ortsständigen Knochens kamen porös- und dichtgesinterte HA-Keramik im Tierversuch zur Implantation. Bei zwei Hunden wurden in die Diaphysen des Femur jeweils ein makromikroporöses HA-Implantat der Dimension 45 x 15 x 10 mm und zwei konusförmige dichtgesinterte Zahnwurzelimplantate (Styli) eingesetzt (Hersteller: Heyl Chemisch-pharmazeutische Fabrik, Berlin). Jedes Versuchstier erhielt somit 6 Implantate.

3.2.1 Formgebung der Implantate und vorbereitende Maßnahmen zur Inkorporation

Bezüglich der geeigneten Dimensionierung der porösen Implantate für den Tierversuch sei auf 3.1.2 verwiesen. Nach der Ultraschallreinigung und Lufttrocknung wurden die HA-Blöckchen zum Ausschluß jeder weiteren Kontamination getrennt in Folien eingeschweißt und dann im Autoklaven sterilisiert. Die Styli kamen im Anlieferungszustand eingeschweißt zur Sterilisation.

3.2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten ein Schäferhund (24 kg) und ein Schäferhund-Bastard (21 kg). Die beiden männlichen Tiere waren jeweils 1 Jahr alt. Während der zweiwöchigen präoperativen Quarantäne waren die üblichen Schutzimpfungen vorgenommen worden.

Die Narkose wurde mit Nembutal i. v. (0,5 mg/kg Körpergewicht) durchgeführt. Im Anschluß daran erfolgte die Intubation. Nun wurden die Oberschenkel mit einem elektrischen Rasierapparat

8 mm distolateral und 4 mm distomedial von der kastenförmigen Osteotomie wurde unter gleichen Bedingungen jeweils eine weitere Bohrung geschaffen (Abb. 18). Sie dienten der Aufnahme von dicht gesinterten Styli. Da diese eine Konusform haben, ließen sie sich beim Vortreiben in die Spongiosa formschlüssig an die Compacta adaptieren. Nach dem Einbringen überragten poröse Keramikblöcke wie Styli die Compacta um ca. 2 mm. Nun wurde das Periost über den Implantaten so weit wie möglich zur Deckung angebracht. Schichtweiser Wundverschluß und Versorgung der Cutis mit Seiden-einzelnähten schlossen sich an. Nebecutansprayverband .

Durch aseptisches und schonendes Operieren, sorgfältige Blutstillung sowie exakte Wundversorgung ließen sich Wundheilungsstörungen und Implantatverluste vermeiden. Die Heilung erfolgte in allen Fällen per primam. Beide Hunde überstanden den operativen Eingriff gut und nahmen am darauffolgenden Tag ausreichend Nahrung zu sich. Sie zeigten während des gesamten Beobachtungszeitraumes - 6 Wochen und 6 Monate - keine Auffälligkeiten.

3.2.3 Präparatgewinnung

Nach 6 Wochen bzw. 6 Monaten wurden die Versuchstiere geopfert. Vor Entnahme der Gewebeproben mit eingeschlossenem Implantat erfolgte Perfusionsfixierung (Abb. 19) i n s i t u . Hierzu wurden:

- I. Die Hunde mit Nembutal (0,5 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und anschließend intubiert,
- II. aorta abdominalis und vena cava inferior freipräpariert,
- III. eine Ligatur ca. 1 cm cranial der bifurcatio aortae abdominalis gelegt (Abb. 19),
- IV. eine weitere unmittelbar kaudal der aa. renalia,
- V. die aorta abdominalis ca. 4 - 5 cm oberhalb der bifurcatio zu 3/4 schräg eröffnet,
- VI. ein Siliconadapter in die eröffnete aorta abdominalis nach caudal eingeführt und bis 2 cm vor die bifurcatio geschoben,
- VII. die Lage des Adapters mit zwei Seidenligaturen gesichert,
- VIII. der Adapter an die Perfusionslösungen (Glutaraldehyd, Heparin/physiol. NaCl-Lösung) angeschlossen,

- IX. dem Tier eine Überdosis (1 ml/kg Körpergewicht) Nembutal i. v. verabreicht,
- X. die vena cava inferior eröffnet,
- XI. die unteren Extremitäten mit Heparin/NaCl (50 000 E Heparin/1000 ml NaCl) bei 37° vorgeflutet,
- XII. unter Kontrolle der Fließrate das Klarwerden der aus der eröffneten vena cava inferior austretenden Flüssigkeit abgewartet (3 - 4 Min.) und
- XIII. der 3-Wege-Hahn (Abb. 19) von Heparin/NaCl auf Glutaraldehyd-lösung (2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer bei pH 7,4), die erst kurz zuvor handerwärmt worden war, umgestellt.

Das Freilegen der Femura erfolgte erst, nachdem die gesamten hinteren Extremitäten steif und blaß waren. Sie wurden von der inserierenden Muskulatur befreit und dann exartikuliert (Abb. 18 b).

Das Heraustrennen der Keramikimplantate erfolgte unter Kochsalzberieselung mit einer Drahtsäge. Dabei wurde so vorgegangen, daß die Implantate von dem umgebenden Knochen bedeckt blieben. Die Femur-Blöcke mit dem makro-mikro-porösen HA wurden in Scheiben der Dicke 4 - 8 mm quer zerlegt. Die Nachfixierung aller Proben erfolgte mit dem gleichen Fixans (2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer bei pH 7,4) über 24 Std. bei 4° C. Danach Entnahme der Präparate aus dem Fixierungsmittel und Lagerung in 0,1 M Cacodylat-Puffer bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung.

3.3 Lichtmikroskopie

Transmissionslichtmikroskopische Untersuchungen an dem anhand der Tierversuche gewonnenen Material dienten der Vorinformation über die Reaktion des knöchernen Implantatlagere auf die Keramik. Das besondere Interesse galt dabei den Befunden in der unmittelbaren Grenzzone Knochen/HA. Zum Vergleich bei der Qualitätsbewertung implantatnaher Strukturen wurden jedoch implantatferne Knochenbereiche mituntersucht. Um hier Aussagen über morphologische Zusammenhänge machen zu können, wurden Präparationstechniken gewählt, die es erlauben, Knochen und Keramik ungetrennt in einem Schnitt zu verarbeiten.

Abb. 19

Perfusionsfixierung der Extremitäten. Nach Freilegung der abdominalen Hauptgefäße (a) wird die Perfusionseinrichtung angeschlossen (b). Die Perfusionslösungen gelangen über die Arterie in die hinteren Extremitäten und strömen durch die Vene aus.

3.3.1 Präparationsmethodik

Die gewonnenen scheibenförmigen Proben wurden ohne weitere Bearbeitung nach den üblichen Verfahren über 2 - 3 Wochen entwässert und in Araldit eingebettet. Mit dem Sägemikrotom wurden unter Kühlung 40 - 70 μm dicke Schnitte bei niedrigen Vorschub-Geschwindigkeiten (7 - 10 Einh.) hergestellt und mit Methylenblau gefärbt. Die auf diese Weise hergestellten Präparate waren zwar im Hinblick auf rißbedingte Artefakte intakt, doch reichten sie aufgrund der Schnittdicke (40 - 70 μm) nicht aus, um histologische Einzelheiten der Zell- und Matrixstruktur erkennen zu können. Dazu mußten mit Hilfe des Hochleistungs-Mikrotoms 3 - 6 μm dicke Bandschnitte hergestellt werden. Dabei handelt es sich um ein Schnittverfahren, bei dem die Schnitte auf Klebefolie (Tesafilm) haften. Damit wird erreicht, daß bröckelige und pulverisierte Fragmente spröden Materials in einem Quasischnitt zusammenhalten. Die am Tesafilm haftenden Schnitte werden auf nasse Objektträger so aufgelegt, daß die klebende Seite des Tesafilms dem Objektträger zugewandt ist. Damit liegt der Schnitt zwischen Objektträger und Tesafilm. Mehrere solcher Objektträger mit Schnitten wurden aufeinander gelegt und 24 Std. bei 40° C in einer Spezialpresse unter mäßigen Druck gesetzt. Danach sind Klebefolie und Schnitt auf dem Objektträger fixiert. Durch 24-stündiges Einlegen der Objektträger in Benzol (zur Analyse, Fa. Merck) werden Araldit und Tesafilm aufgelöst. Der auf dem Objektträger verbleibende Schnitt wurde dann Ladewig- oder Giemsa-Färbung unterzogen.

3.3.2 Geräte

Lichtmikroskop: Ernst Leitz Orthoplan 666521 mit Fotoaufsatz Orthomat.

Leitz Sägemikrotom 1600

Hochleistungs-Mikrotom Zeiss 478910

3.3.3 Befunde

Über die histologischen Befunde an der Grenzschicht HA/Knochen haben wir an anderer Stelle bereits berichtet (BAGAMBISA 1984, 1985; FISCHER-BRANDIES et al. 1985; DIEBERT et al. 1985). Deshalb seien sie in dieser Arbeit nur kurz abgehandelt.

Bei der Präparatgewinnung waren die HA-Implantate makroskopisch gut und reizlos eingeeilt. Es bestanden keine Anzeichen einer entzündlichen Reaktion oder gar einer Infektion des Lagergewebes. Keines der 12 Implantate war verlorengegangen. Ihr enossaler Teil (Abb. 18) war eng von zugebildetem Knochen umgeben. Ohne Zerstörung waren sie nicht aus dem Lager entfernbar. Dies gilt für beide Liegezeiten - 6 Wochen bzw. 6 Monate.

Die makroskopische Aufnahme (Abb. 20) läßt erkennen, daß zugebildeter Knochen an dem Stylus emporgewachsen ist. Er stellt sich heller als die übrige Compacta dar. So kommt es zu einer weitgehenden Nivellierung des extraossalen Implantatanteils bereits nach 6 Wochen. Diese vor allem periostale Apposition dürfte auf die Schwächung der Compacta durch das Schaffen des Implantatla-



Abb. 20

Stylus in der Femurdiaphyse
mit Schleifspuren auf dem
Implantat

Makroskopische Querschliff-
aufnahme

Liegezeit 6 Wochen, enteiweißt
x 3

gers zurückzuführen sein. Zur Kompensation wird die stylusnahe Compacta verstärkt. Sowohl Compacta wie Spongiosa liegen dem dichtgesinterten Implantatkörper dicht an. Die Spongiosastruktur ist weitgehend ungestört. Die verdichteten Zonen unterhalb der Durchtrittsstelle können wiederum als mechanische Anpassungsmechanismen gedeutet werden.

Diese Tendenz ist auch bei den mikroporösen Keramikblöcken (Abb. 21) erkennbar. Hier ist es nach 6 Wochen zu einer vollständigen Integration des Implantats gekommen. Die interkonnektierenden Poren sind vollständig durchwachsen. Da das Präparat nicht enteiweißt ist, muß offenbleiben, ob es auch vollständig knöchern durchwachsen ist. Eine Randspaltbildung ist an keiner Stelle erkennbar.

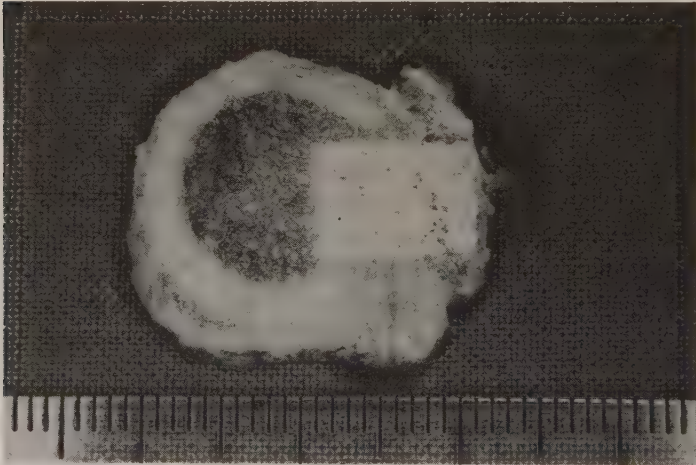


Abb. 21

Makroporöser HA-Keramikkblock in der Femurdiaphyse

Makroskopische Querschliffaufnahme

Liegezeit 6 Wochen, nicht enteiweißt

x 3

Die Abb.22 zeigt die ein makroporöses Implantat (HA) umgebenden knöchernen Strukturen nach 6 Wochen Liegezeit. Die alte Compacta (C) stellt sich dunkler dar. Der zugebildete junge Knochen ist heller und durch Pfeile gekennzeichnet. Der periostale Knochenanbau ist hier besonders eindrucksvoll, da er auch implantatfern stattgefunden hat. Er kann ebenfalls auf eine osteotomiebedingte

Veränderung des Belastungsmusters zurückgeführt werden. Da anfangs in den Implantatskörper keine statischen und dynamischen Kräfte eingeleitet werden können, erfolgt zur Belastungsminderung des Knochens pro Flächeneinheit zunächst periostale Apposition. Diese Anpassungsmechanismen werden notwendig, da die Extremitäten der Hunde zu keinem Zeitpunkt in irgendeiner Weise geschient worden waren. Die Versuchstiere konnten sich frei bewegen. Das Implantat (HA) ist an den beurteilbaren zwei Seiten ohne Spaltbildung fest in Compacta bzw. Spongiosa integriert.

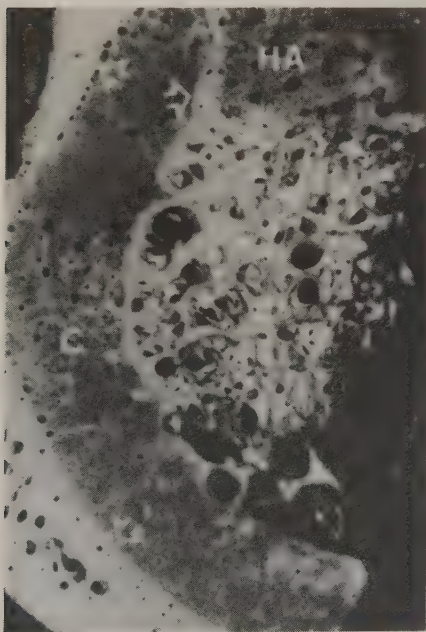


Abb. 22

Makroporöses Implantat (HA) in der Femurdiaphyse. Der Compacta (C) ist durch Pfeile gekennzeichneteter zugebildeter Knochen (heller) an- bzw. aufgelagert

Makroskopische Querschliffaufnahme

Liegezeit 6 Wochen, enteiweißt
x 5

Die periostale Knochenapposition ist in dem histologischen Bild (Abb. 23) gut erkennbar. In der Ladewig-Färbung stellt sich alte Compacta grün dar, während der junge Knochen blau zur Darstellung kommt. Organische Bestandteile und Knochenvorstufen sind rot eingefärbt. Das abgelöste Periost hat ehemals am oberen Bildrand gelegen. Der Knochenumbau in der alten Compacta ist gut erkennbar.

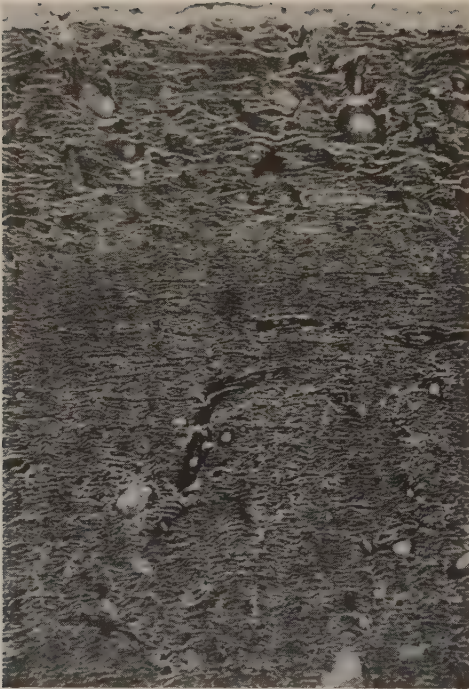


Abb. 23

Alte Compacta (unten) und
zugebildeter junger Knochen
(oben)

Implantatfern in der Ladewig-
Färbung

x 40

In den Abb. 24 a und b ist die Kontaktzone Knochen/HA dargestellt. Die Implantate kommen dunkelgrün zur Darstellung, während der zugebildete Knochen hellbraun erscheint. Die Osteozyten erscheinen als linsenförmige Gebilde und sind parallel zur Implantatoberfläche angeordnet. Bindegewebe kommt blau zur Darstellung. Die Implantate sind an keiner Stelle bindegewebig eingeschieden. Die Abb. 24 a zeigt dichtgesinterte HA-Keramik, während es sich in der Abb. 24 b um makroporöse Keramik handelt. Das Einwachsen jungen Knochens in eine Pore ist erkennbar. Es deutet sich die Tendenz an, daß der Knochen sich zunächst der Keramikoberfläche anlagert.



Abb. 24 a

Kontaktzone dicht gesinterte Keramik / Knochen

Liegezeit 8 Monate, Methylenblau

Fremdaufnahme (FISCHER-BRANDIES et al. 1985, unveröff. Ergebnisse)

x 18

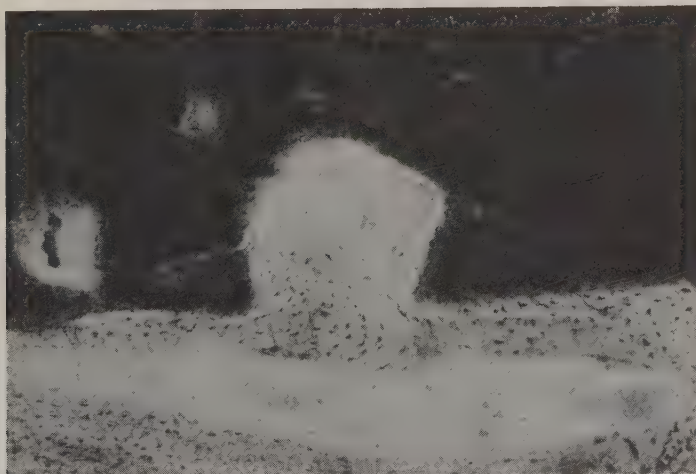


Abb. 24 b

Makroporöser Keramikblock mit Lagerknochen

Liegezeit 5 Monate, Methylenblau

Fremdaufnahme (FISCHER-BRANDIES et al. 1985, unveröff. Ergebnisse)

x 84

Die Abb. 25 a - c zeigen die knöcherne Durchwachsung der inter-konnektierenden Poren.

In der Abb. 25 a ist die linke Pore vollständig knöchern aufgefüllt. In dem Havers'schen System sind die Osteozyten konzentrisch um die Havers'schen Gefäße angeordnet. Zwischen Knochen und Keramik ist kein Bindegewebe eingelagert.

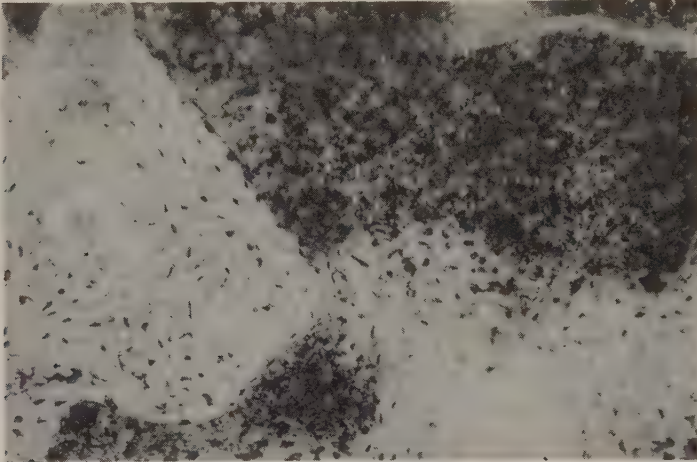


Abb. 25 a

Havers'sche Systeme in der Porosität von HA-Keramik. Um das zentrale Gefäß sind die Osteozyten konzentrisch angeordnet.

Liegezeit 5 Monate, Methylenblau

Fremdaufnahme (FISCHER-BRANDIES et al. 1985, unveröff. Ergebnisse)

X 144

Die Abb. 25 b zeigt ein in Bildung begriffenes Havers'sches System in der Giemsa-Färbung. Der sich ausbildende Knochen (violett) ist der Keramikoberfläche (nicht dargestellt) zugewandt. Die Osteoblastenreihe ist rechts und links erkennbar. Zum Zentrum hin sind Knochenmarkzellen dargestellt.

Die Abb. 25 c zeigt ein vollständiges Havers'sches System, das einer Pore entnommen ist. In der Ladewig-Färbung ist der neugebildete Knochen blau, während Osteoid rot zur Darstellung kommt. Im Zentrum findet sich eine Kapillare mit Endothelzellen. Die konzentrisch angeordneten Osteozyten kommen ebenfalls rot zur Darstellung.

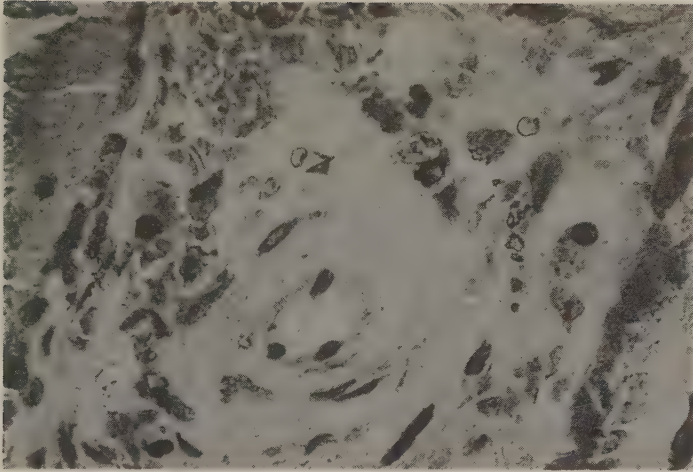


Abb. 25 b

In Ausbildung begriffenes Havers'sches System mit jungem Knochen,
Osteoblastensaum und Knochenmarkszellen
Liegezeit 6 Monate, Giemsa-Färbung
x 800

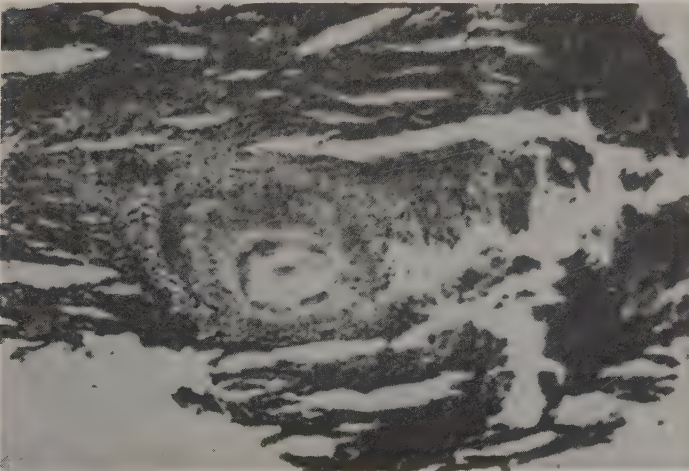


Abb. 25 c

Aus einer Pore herausgelöstes voll ausgebildetes Havers'sches
System
Liegezeit 6 Monate, Ladewig-Färbung
x 320

Die Abb. 26 a - c zeigen in der Ladewig-Färbung die knöcherne Durchwachsung von interkonnektierenden Poren in HA-Keramik. Das Implantat selbst ist präparationsbedingt entfernt. Beim Vergleich mit der Abb. 23 zeigt sich, daß die Knochenbildung hier die gleiche Gesetzmäßigkeit aufweist wie bei der periostalen Knochenapposition. Knochenan- und -umbau finden gleichzeitig statt.

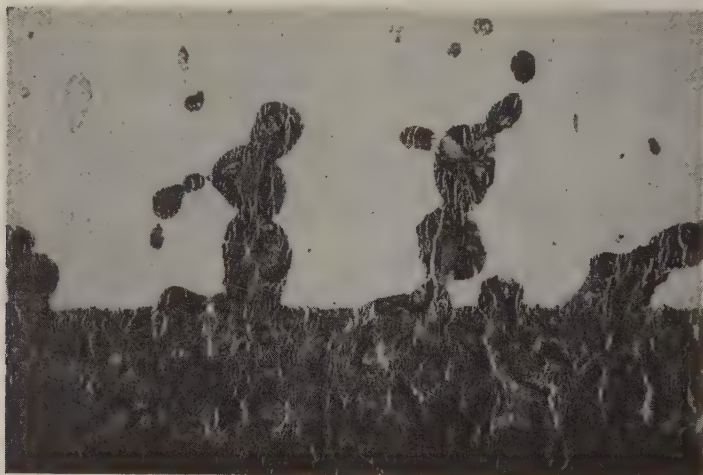


Abb. 26 a

Zugebildeter Knochen in der Umgebung des Implantates und in den interkonnektierenden Poren

Liegezeit 6 Wochen, Ladewig-Färbung, ohne Filter

x 32

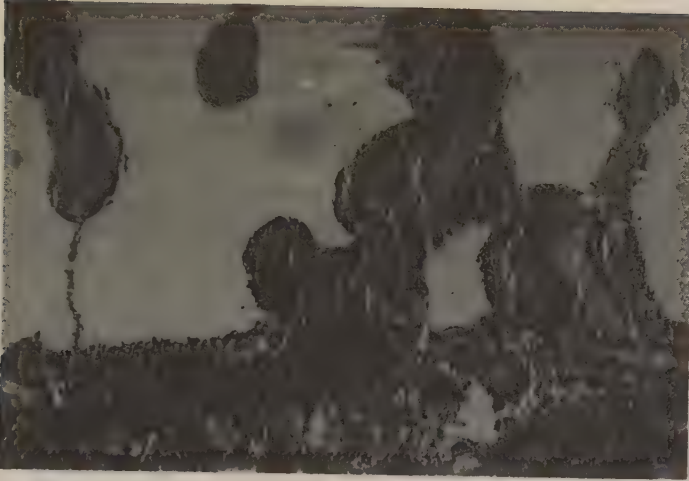


Abb. 26 b

Lebhafter Knochenumbau in Makroporen und Implantatumgebung
Liegezeit 6 Monate, Ladewig-Färbung, Gelbfilter
x 48

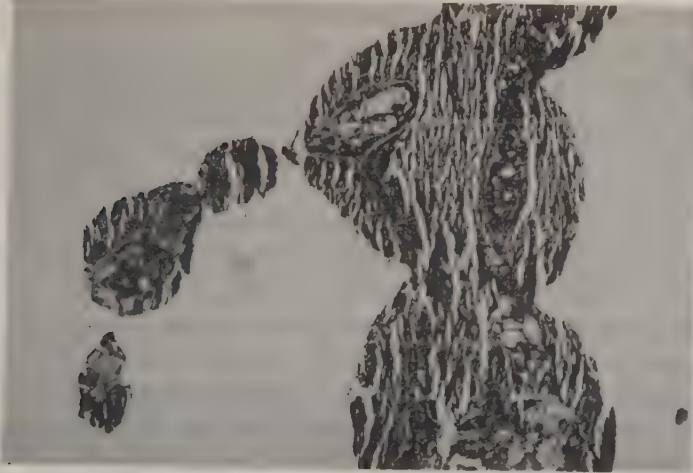


Abb. 26 c

Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 26 a
Die Osteozyten kommen als kleine rote Gebilde in blau eingefärbtem Knochen zur Darstellung
Liegezeit 6 Wochen, Ladewig-Färbung, Blaufilter
x 140

3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Über die Morphologie und Topographie des Knochengewebes auf ultrastruktureller Ebene gehen die Meinungen bis heute auseinander (2.5). Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, daß das Transmissions-elektronenmikroskop (TEM) wegen seines überlegenen Auflösungsvermögens zur Ermittlung der biologischen Ultrastruktur bevorzugt wird. Da die Auflösung des Instruments jedoch umso besser wird, je dünner die Probe ist, bedingen Hochauflösungsuntersuchungen einen Kompromiß bei der dreidimensionalen Strukturdarstellung.

Eine Hochauflösungsuntersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) ist grundsätzlich auch möglich, da für viele der handelsüblichen REM-Geräte ein Auflösungsvermögen von $80 \text{ \AA}$ angegeben wird. Mit dem REM wird die Oberflächenmorphologie untersucht. Seine Leistung ist hierbei in keiner Weise durch die Probendicke beeinträchtigt. Ferner besitzt das REM eine Schärfentiefe, die $300 \times$ so groß ist wie die des Lichtmikroskopes. Dadurch ermöglicht das REM optisch dreidimensionalgetreue Bilder des Untersuchungsobjektes.

Ein weiterer Vorteil des REM gegenüber dem TEM ist in der großzügiger dimensionierten Probenkammer zu sehen. Während Proben zur Untersuchung im TEM auf ein Maß kleiner als $1 \times 1 \text{ mm}$ zugeschnitten werden müssen, um sie dann mittels eines Mikrotoms zu Schichten einiger Hunderte Angström dick zu schneiden, erübrigen sich bei REM-Untersuchungen diese Maßnahmen. Hierbei kann die gesamte Probe in die Kammer eingeführt und untersucht werden. Bei den vorliegenden Untersuchungen bot es sich somit an, auf ein und derselben Probe jeweils das Innere des Implantates, die Knochen/Implantat-Grenze sowie das umliegende Lagergewebe zu überprüfen.

Die Anfangsvergrößerung liegt im TEM um $\times 15\,000$ und läßt sich entsprechend der Ausrüstung bis auf $\times 500$ verringern. Bei handelsüblichen REM-Geräten jedoch liegt die Anfangsvergrößerung bei $\times 20$. Dies läßt die Beurteilung des zu untersuchenden Bereiches von der Übersichtsaufnahme bis in den Ultrastrukturbereich zu.

Bei elektronenoptischen Untersuchungen biologischer Proben wird eine Probentrocknung notwendig. Unter Betriebsbedingungen stehen Säule und Probenkammer unter Vakuum (10^{-4} Torr und höher), damit der Elektronenstrahl nicht abgelenkt wird. Die nicht sorgfältige Probentrocknung kann zu Artefakten und dadurch zu Fehldeutung führen.

3.4.1 Präparationsmethodik

Von dem aus Tierversuchen gewonnenen Material wurden lediglich getrocknete bzw. enteweißte, teilenteweißte sowie teilentmineralisierte Proben hergestellt.

a) Zur Vorbereitung von Proben der ersten Gruppe (lediglich getrocknet) wurden die Präparate dem Cacodylatpuffer entnommen und zunächst 20 Min. in Wasser gespült. Dieses war - wie im folgenden - destilliert, entmineralisiert und von CO_2 befreit worden. Dann wurde jeweils eine Probenfläche schrittweise mit handelsüblichem Schleifenpapier Nr. 240, 320, 400 und 600 - entsprechend den Korngrößen 60, 45, 36 bzw. 24 μm - handgeschliffen. Das Schleifen erfolgte langsam, unter möglichst geringer Druckanwendung und ständiger Wasserberieselung. Zur gleichmäßigen Orientierung eventueller Schleifspuren wurden gleichbleibende Schleifbewegungen - auch beim Papierwechsel - angestrebt. Diese erfolgten jeweils in einer Richtung (z. B. immer nach rechts), in zwei entgegengesetzten Richtungen (z. B. immer nach rechts und links) bzw. kreisförmig. Die Schleifproben wurden 6 - 8 Mal jeweils über 10 Min. in Wasser gespült, 30 Min. in Wasser belassen und schließlich über 3 - 6 Min. im Ultraschallgerät (3.1.2.1) gereinigt.

Werden biologische Proben direkt nach der Entnahme aus Wasser oder Lösung luftgetrocknet, so entstehen bei mechanisch empfindlichen Bestandteilen Risse und Distorsionen aufgrund der hohen Oberflächenspannung des Wassers. Von den verfügbaren Methoden des strukturschonenden Wasserentzugs kamen die Trocknung aus möglichst neutralen Flüssigkeiten mit niedriger Oberflächenspannung sowie die Critical-Point-Trocknung zur Anwendung (BOYDE u. WOOD 1969). Bei der Critical-Point-Methode handelt es sich um Trocknung unter Druck in einem geschlossenen System. Die Oberflächenspannung ist dabei gleich Null. Das Ersetzen des Wassers durch die Entzugsflüssigkeiten soll stufenweise erfolgen. Die Verweildauer jedoch ist so niedrig zu halten, um dem Fortschreiten eventueller Reaktionen mit bestimmten Probenbestandteilen Einhalt zu gebieten. Das bestgeeignete Vorgehen bei den eigenen Proben mußte erst entwickelt werden (Tab. 5).

Der Ultraschallreinigung folgte Wasserentzug in der aufsteigenden

Alkoholreihe (Äthylalkohol Merck, zur Analyse) - 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 % und 100 %. Die Verweildauer der Proben in den jeweiligen Stufen wurde entsprechend der Probendicke variiert. Die Angaben in Tab. 5 entsprechen einer mittleren Probendicke von 3 mm.

Konzentration	Wechselsequenz	Verweildauer
30 %	1 x doppelt	20 Min.
50 %	1 x doppelt	30 Min.
70 %	1 x doppelt 2 x einfach	20 Min. 20 Min.
90 %	1 x doppelt 2 x einfach	20 Min. 20 Min.
96 %	2 x doppelt 1 x einfach	15 Min. 20 Min.
100 %	2 x doppelt 1 x einfach	15 Min. 15 Min.

Tab. 5

Eigenes Vorgehen zum Wasserentzug in der aufsteigenden Alkoholreihe. Einfach = ohne Vorspülen im Medium. Doppelt = mit Vorspülen

Nachdem das Probenwasser durch Äthanol 100 % ersetzt worden war, wurde nun Äthanol in der aufsteigenden Reihe Amylacetat in Äthanol entfernt. Die Amylacetatkonzentrationen betrugen hierbei 25 %, 50 %, 75 % und schließlich 100 %. Wechselsequenz : 2 x einfach. Verweildauer: jeweils 15 Min. Bei jedem Trocknungsvorgang wurde auf das Verbleiben der Probe unterhalb des Flüssigkeitsspiegels sowie auf möglichst schnelles Arbeiten beim Mediumwechsel geachtet. So sollte vorzeitiges Verdunsten der Lösung vermieden werden. Nach der Stufe Amylacetat 100 % kamen die Proben auf Filterpapier zum Verdunsten unter Abzugsbedingungen zu liegen.

Vor den rasterelektronenoptischen Untersuchungen der Schliff-
flächen wurden die Proben auf Aluminium-Objektträgern fixiert
und bedampft. Die Bedampfung erfolgte zunächst mit einer 200 Å
starken Kohlenstoff- und anschließend mit einer Goldschicht
(300 Å). Alle getrockneten Proben kamen in einen evakuierten,
mit Kieselgel versehenen Exikkator zur Aufbewahrung.

b) Zur Aufklärung ultramorphologischer Zusammenhänge zwischen
in v i v o gefällttem biologischem Apatit und dem implantier-
ten Sinter-Apatit wurden e n t e i w e i ß t e P r o b e n
hergestellt. Ohne Entfernung des organischen Anteils waren Struk-
tureinzelheiten des Knochenminerals rasterelektronenoptisch
kaum zu erfassen. Zur Enteiweißung kam auch das von LESTER u.
ASH (1981) hinzugezogene Verfahren unter Modifikation der Ver-
weildauer zum Einsatz.

Die puffergelagerten Präparate wurden - wie in 3.4.1 a) angege-
ben - gespült, geschliffen sowie gereinigt und dann bei 4° in
5 %igem Natriumhypochlorit über 12 - 24 Stunden (entsprechend
der Probendicke) enteiweißt. Danach erfolgte 20minütiges sorg-
fältiges Spülen in Wasser vor dem Wasserentzug mittels Äthanol-
reihe. Die Reihenfolge beim Ersetzen des Probenwassers durch Ätha-
nol wurde wie in 3.4.1.a) gewählt. Dies mit dem Unterschied, daß
die in Tab. 5 angegebenen Verweildauern um jeweils ca. - 5 Min.
gekürzt wurden. Die Enteiweißung hatte erwartungsgemäß bereits
zu einer Abnahme der Probendichte geführt. Dem Wasserentzug folg-
te Lufttrocknung nach Amylacetat 100 %, Äther 100 % bzw. Criti-
cal-Point-Trocknung. Lufttrocknung nach Amylacetat 100 % kam wie
für lediglich getrocknete Proben (3.4.1 a) zur Anwendung.

Zur Trocknung nach Äther 100 % wurden die Proben, die bereits
in Äthanol 100 % gelegen hatten, luftgetrocknet (30 Min.). Zuvor
waren sie einer aufsteigenden Reihe von Äther in Äthanol -
gleicher Konzentrations- sowie Verweildauerbedingungen wie für
Amylacetat (3.4.1) - unterzogen worden.

Beim Critical-Point-Verfahren wurde jeweils eine zu trocknende
Probe nach Äthanol 100 % oder Amylacetat 100 % in die zur Hälfte
mit Äthanol 100 % bzw. mit Amylacetat 100 % gefüllte Trockner-
kammer eingebracht. Nach Verschluß der Kammer des mit CO₂ arbei-

tenden Trockners erfolgte Probenspülung 8 - 12 Mal (entsprechend der Dicke) mit CO_2 bei 14°C . Anschließend Anheben der Temperatur bis oberhalb 32°C . Wie in 3.4.1 a) bereits erwähnt, wurde auch hier auf Verbleiben der Probe unterhalb des Flüssigkeitsspiegels geachtet.

Vor den REM-Untersuchungen wurden die Proben durch Leitsilber auf Aluminium-Objektträgern fixiert. Bestand die Gefahr des Eindringens von Leitsilber in die Probe aufgrund geringer Probendicke und hoher Porosität, so wurde statt dessen Leitkohlenstoff (Leit-C-Plast, Neubauer Chemikalien, BRD) oder beidseitig klebendes Tesafilm angewandt. Anschließend Versehen der Proben mit einer Goldschicht 150 bzw. 300 Å (3.1.1, 3.1.1.1).

Nach Auswertung der Querschliffe im REM wurden auch Bruchflächen aus einem Teil der Proben durch einfaches Zerschneiden fixiert, bedampft (s. o.) und dem REM zugeführt. Diese Maßnahme bietet den Vorteil, daß Bruchflächen weniger Bearbeitungsartefakten zeigen als die Schliffflächen. Die Bruchflächen wurden mit Hilfe von zwei sauberen Zangen erzeugt.

c) Teilenteiweißte Proben sollten Informationen über strukturelle Zusammenhänge zwischen organischem und anorganischem Knochengewebe im Implantatbett liefern. Dies mit dem Ziel, näheres über das Verhalten des organischen Knochengewebes gegenüber dem künstlichen Werkstoffapatit zu erfahren. Entfernt werden sollten vor allem Knochenzellen sowie nichtkollagene organische Matrixanteile unter Schonung der Kollagenstruktur. Durch Entblößung des Kollagen/Apatit-Komplexes sollten ihre engeren Beziehungen besser beurteilbar werden.

Zum Entfernen nichtkollagener Bestandteile diente Trypsinlösung. Nach Schleifen und Reinigung (3.4.1 a) wurden die Proben der Teilenteiweißung durch Überschwemmen in einem Glasbehälter mit 1 %igem Trypsin 0,1 M Cacodylatpuffer bei pH 7,4 über 24 Stunden bei 37°C (Brutkasten) unterzogen. Entwässerung wie in 3.4.1 a. Critical-Point-Trocknung und Bruchflächenerzeugung wie in 3.4.1 b. Goldbedampfung und REM-Untersuchung wie in 3.1.1, 3.1.1.1 bzw. 3.4.1 a.

d) Zur Herstellung entkalkter Proben wurden einige Proben von einem Teil der anorganischen Salze befreit.

Dies bewirkt ein Zutagetreten des organischen Teils des Knochengewebes. So sollten Einzelheiten über das Implantat durchwachsende organische Strukturen erfaßt werden. Die Entkalkung wurde gleich nach Fixierung und Nachfixierung (3.2.3) vorgenommen. Dies ohne zusätzliche Vorbereitung.

Die Proben wurden hierzu in 37 %iger Äthyldiamintetraessigsäure (EDTA) suspendiert und bei 4°C über 4 - 6 Monate gelagert. Nachfolgend Probenspülung und aufsteigende Alkoholkonzentrationsreihe. Dann Critical-Point-Trocknung (3.4.1 b). Danach wurden Schnittflächen mit Hilfe eines Skalpell erzeugt. Fixierung auf Aluminium-Objektträgern und Bedampfung (3.4.1 b).

e) Die Untersuchungen schlossen Zähne von Erwachsenen ein, die aus prothetischen bzw. paradontotischen Gründen extrahiert worden waren. HA findet sich in Zahnschmelz und Dentin wie im Knochengewebe. Vergleichsuntersuchungen an menschlichen Zähnen dienten der Fragestellung, ob bezüglich des biologischen Apatits Gemeinsamkeiten bestehen. Untersucht wurden klinisch kariesfreie Zähne von gesunden Individuen beider Geschlechter im Alter zwischen 24 und 40 Jahren. Unmittelbar nach der Extraktion wurden die Zähne in Glasbehälter mit 2 %igem Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer bei pH 7,4 eingelegt. Sie verblieben bei 4°C über max. 24 Std. Um die spätere Brucherzeugung zu erleichtern, wurden in einigen Fällen kleine longitudinale Rillen vorgeschnitten. Das Fräsen erfolgte mit Diamantschleifkörpern bei niedriger Tourenzahl unter Wasserberieselung, um so thermische Einflüsse auszuschalten. Die Proben wurden mehrmals in Wasser gespült und schließlich 30 Min. gelagert. Dann Enteiweißung in 5 % NaOCl über 12 Std. Die enteiweißten (anorganischen) Proben wurden mehrmals mit Wasser gespült und gelagert wie oben.

Zum Wasserentzug Alkoholkonzentrationsreihe 50 %, 70 %, 90 %, 96 % und 100 % über 20, 20, 30, 30 bzw. 15 Min. Die Wechselfolge variierte zwischen 1 x doppelt und 2 x doppelt.

Anschließend wurden die Proben mit 25 %, 50 %, 75 % Diäthyläther in Äthanol über 20, 15 bzw. 15 Min. gelagert und schließlich 15 Min. in Äther 100 % eingebracht.

Zum Trocknen kamen die Proben aus Äther 100 % auf Filterpapier

unter Abzugsbedingungen zu liegen und wurden so luftgetrocknet. Aus den trocknen, enteiweißten Zähnen wurden unter Ausschluß jeder Kontamination Bruchstücke erzeugt. Dies geschah mittels Spaltung in der vorgefrästen Rille. Weitere Bruchflächen wurden erzeugt, indem mittels einer sauberen Zange die Probe in zwei Teile gebrochen wurde.

3.4.2 Geräte

Rasterelektronenmikroskope: Hitachi S 800 (3.1.1.1).

Jeol JSM-35F

Cambridge Instruments S4 10.

Bedampfungsgeräte: Edwards

Polaron 500 sputter coater

Trocknungsgerät: Critical point dryer CPD 020 (Firma Balzers).

3.4.3 Befunde

Eine Beurteilung der Grenzschicht Keramikimplantat/Lagergewebe auf morphologischer Grundlage setzt die Unterscheidungsmöglichkeit der jeweiligen strukturellen Merkmale voraus. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die Charakterisierung der Ausgangsstoffe (Merck Pulver) und der Sinterprodukte (3.1.1.2 und 3.1.2.2). Der nächste Schritt ist die Festlegung der techtonischen Charakteristika des Knochengewebes. Als Grundlage dienen die von BOYDE u. HOBDELL (1969 a, 1969 b), BOYDE (1972) und DEMPSTER et al. (1979) aufgestellten Kriterien. Darin sind die morphologischen Kennzeichen der Periost- und Endostflächen sowie die der Schliff- und Bruchflächen von Knochengewebe geschildert. Zu unterscheiden ist grundsätzlich zwischen jungem (Abb. 27 - 31) und reifem Knochen (Abb. 32 - 36).

a) Abb. 27 zeigt jungen enteiweißten - "anorganischen" - Knochen bei niedriger Vergrößerung. Oben links und rechts, in der Bildmitte sowie unten sind elliptische Eindellungen, die Osteozytenlakunen (2.5 b) entsprechen, erkennbar. Hier waren vor dem Enteiweißungsvorgang Osteozyten eingemauert. Im unteren Drittel zieht ein trocknungsbedingter Riß von rechts nach links durch den oberen Rand der dort befindlichen Osteozytenlakune. Sie hat einen Durchmesser von ca. $20 \times 7 \mu\text{m}$. Bei weiterer Vergrößerung der in der Mitte von Abb. 27 dargestellten Osteozytenlakune

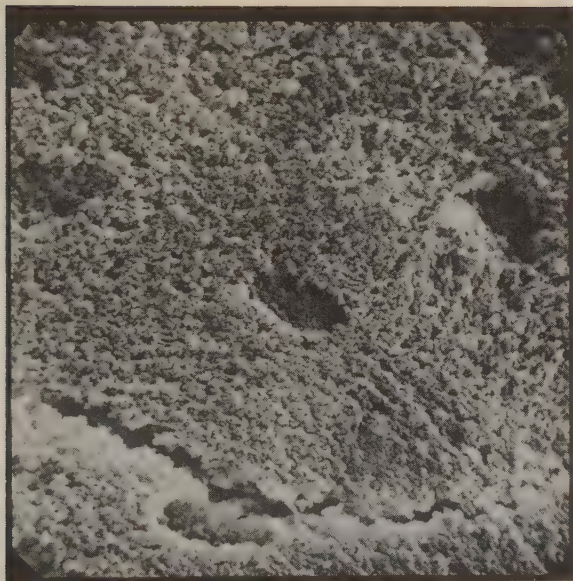


Abb. 27

Junger Knochen. Mineralisierungsfront mit Osteozyten-Lakunen
Bruchfläche

Enteweißt, luftgetrocknet nach Äther 100 %

REM-Aufnahme

x 1050

(Ø 18,5 x 8,5 µm) tritt die enteweißungsbedingte Porosität des anorganischen jungen Knochens deutlich hervor (Abb. 28). Am detaillierter wiedergegebenen Lakunenboden und an den umliegenden Bruchflächen stellen sich die kugel- über länglich oval bis spindelförmigen Knochenmineralcluster dar. Die den Lakunenboden durchdringenden Canaliculi befinden sich noch in Bildung und sind in ihrer Form unregelmäßig.

Die meist spindelförmigen Mineralcluster wachsen zum Teil konfluierend. Sie weisen einen durchschnittlichen Durchmesser von $1,3 \pm 0,5$ µm auf. Bei noch jüngerem Knochen der Mineralisierungsfront treten sie auch als kleinere Gebilde, etwa im oberen Teil der Abb. 29, auf. Die Mineralcluster nehmen durch Aggregation an Größe zu, bis sie schließlich einzeln kaum mehr zu erfassen sind. Diese Entwicklung ist in Abb. 29 zu erkennen.

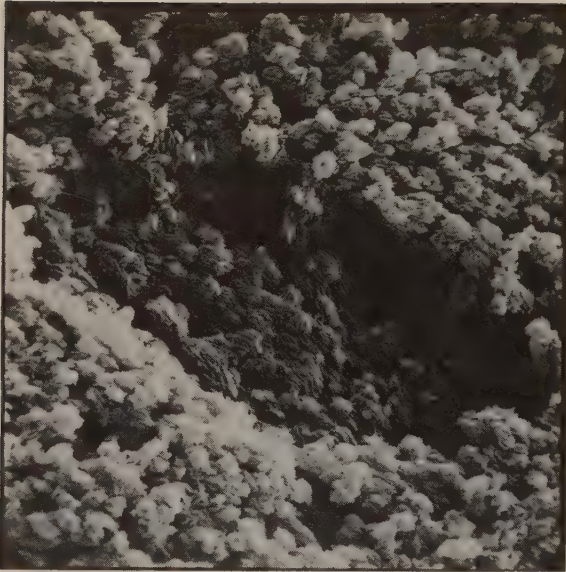


Abb. 28

Ausschnittsvergrößerung von Abb. 27. Von Canaliculi durchdrungene Osteozytenlakune aus Mineralclustern (Calcosphäriten) unterschiedlicher Dimension und Gestalt.

Bruchfläche

Enteiweißt

REM-Aufnahme

x 5300

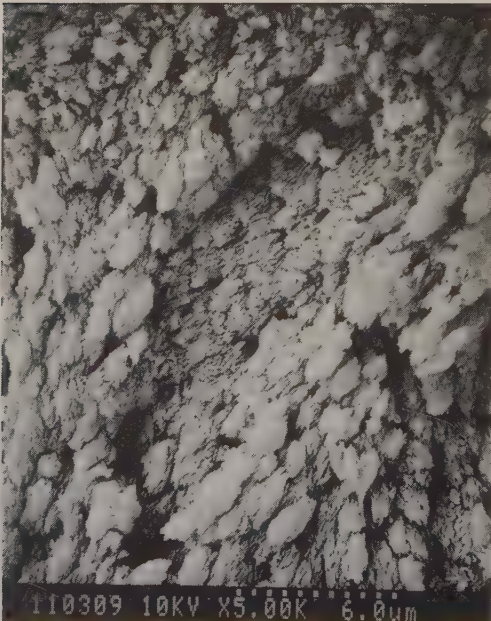


Abb. 29

Junger Knochen. Lakune aus Calcosphäriten mit Canaliculi am Lakunenboden

Bruchfläche

Enteiweißt, luftgetrocknet nach

Äther 100 %

REM-Aufnahme

x 5000

In der Mitte des Bildes verläuft eine Osteozytenlakune ($\emptyset$ 20,0 x 6,5 μm) schräg von rechts oben nach links unten. Die beiden Canaliculi-Öffnungen haben hier einen Durchmesser von ca. 2,2 μm . Am Lakunenboden befinden sich noch kleinere Canaliculi-Öffnungen ($\emptyset$ ca. 0,7 μm). Die Canaliculi sind bereits besser ausgebildet, und der Lakunenboden ist glatter als in Abb. 27 und 28. Der anorganische Knochen besteht mit Ausnahme des oberen Drittels im Bild aus elliptisch gestalteten Mineralclustern der Durchmesser 1 x 1,2 μm .

In Abb. 28 und 29 verlaufen auf den Mineralcluster-Oberflächen helle, längs ausgerichtete strangartige Strukturen ($\emptyset$ 500 Å). Bei stärkerer Vergrößerung lassen sich diese Strukturen als Kanten von Septen bzw. Wänden ausmachen (Abb. 30). Sie trennen dabei Furchen unterschiedlicher Länge und Durchmesser. Diese gehen in die Zwischencluster-Hohlräume über. Dieses Muster kommt in der rechten Hälfte der Abb. 30 und in Abb. 31 gut zur Darstellung. Es lassen sich kleinste Einzelfurchen mit Breiten von 500 - 1200 Å erkennen.

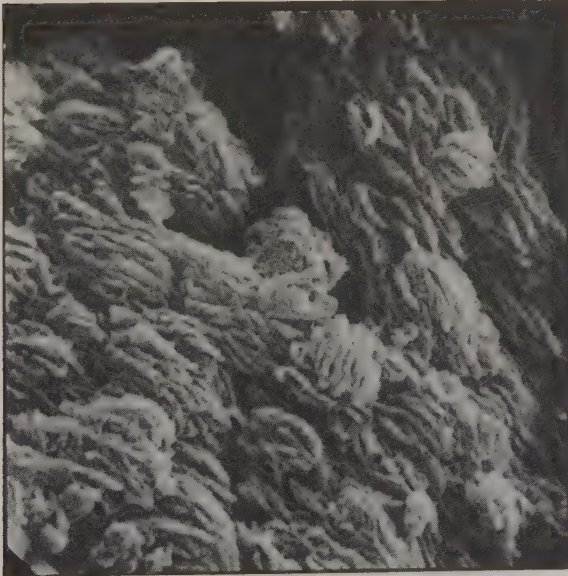


Abb. 30

Ausschnittsvergrößerung eines Lakunenbodens aus der Mitte der Abb. 28. Konfluierende Calcosphärite sind zum Teil von Furchen durchdrungen
Bruchfläche
Enteiiweißt
REM-Aufnahme
x 21 000

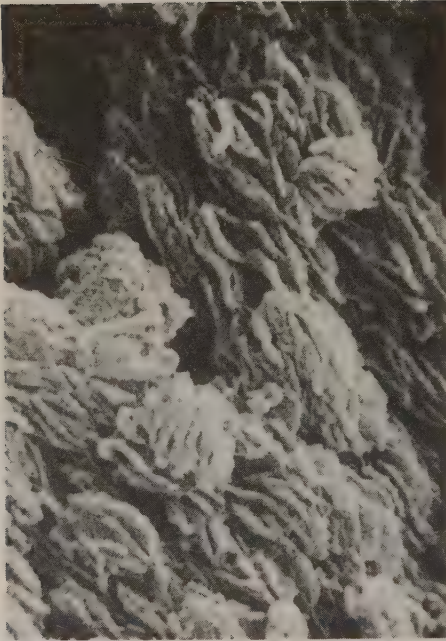


Abb. 31

Die Ausschnittsvergrößerung
der rechten Hälfte von Abb.
30 verdeutlicht die Furchen
REM-Aufnahme
x 27 460

Abb. 32 stellt die Oberfläche reifen Knochens dar. Diese Fläche zeigt zum Teil Bereiche, die unterhalb des umliegenden Knochens liegen. Diese muschelförmigen Buchtungen (Resorptions-Lakunen) grenzen sich durch scharfe Kanten gegeneinander und gegen die umliegende Matrix ab. Der Bildmitte von Abb. 32 entstammt die Ausschnittsvergrößerung in Abb. 33. Hier tritt bereits Mineralablagerungsmuster reifen Knochens hervor. Im Gegensatz zu den Mineralclustern der Abb. 27 - 31 lagert sich hier das Mineral in Fasern und Bündeln ab. Abb. 34 gibt eine weitere Vergrößerung der Mitte von Abb. 33 wieder. Unterschiedlich lange, faserförmige Mineralaggregate verlaufen weitgehend in einer Richtung. Die Einzelmineralfasern verlaufen mehrfach einander schneidend, zusammen- und auseinandertretend. Nicht nur zwischen den Einzelgebilden lassen sich unterschiedliche Durchmesser feststellen, vielmehr bestehen auch Schwankungen bei ein und demselben Gebilde. Dabei variiert der Durchmesser zwischen 700 und 2 000 Å.

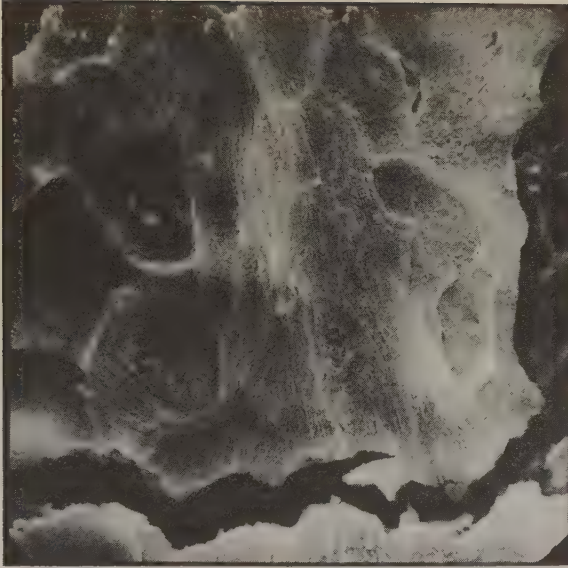


Abb. 32

Bruchfläche reifen Knochens mit scharf getrennten Buchtungen (Howship'schen Lakunen), die auf osteoklastische Tätigkeit hinweisen. Enteiweißt, luftgetrocknet nach Äther 100 %

REM-Aufnahme

x 1050

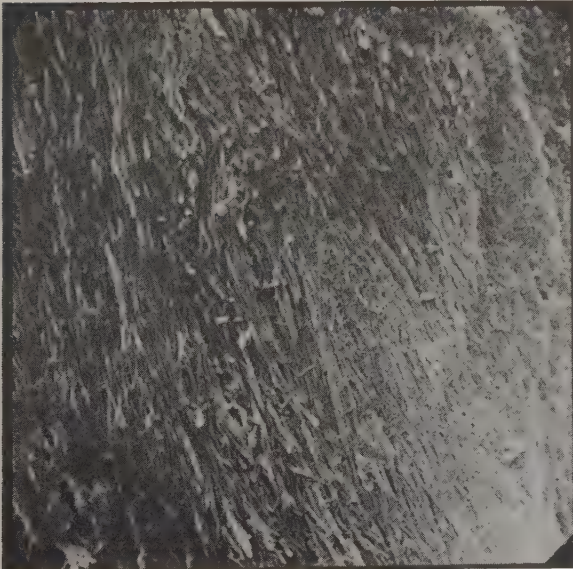


Abb. 33

Boden einer Howship'schen Lakune aus Abb. 32 Mitte.

REM-Aufnahme

x 5300

Die Oberfläche der Mineralgebilde ist nicht glatt, sondern läßt untergeordnete kugelige Mineralbausteine ($500 - 1000 \text{ \AA}$), die den einzelnen Fasern ein granuläres bis perlenkettenförmiges Aussehen verleihen, sichtbar werden (Abb. 34 u. 35).

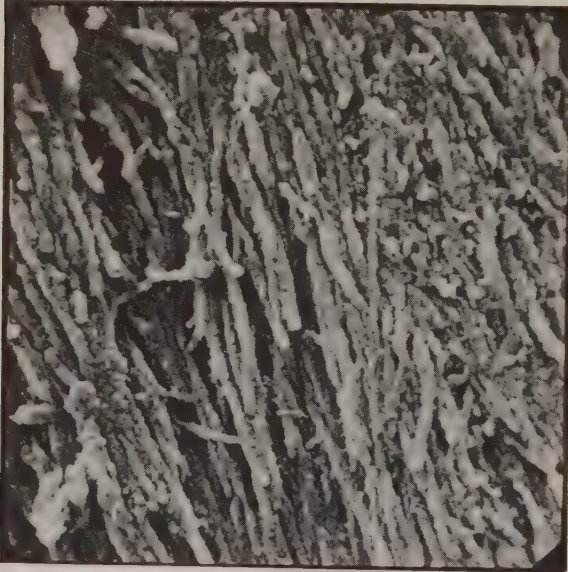


Abb. 34

Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 33 Mitte. Die Mineralablagerung reifen Knochens stellt sich als perlenkettenförmiges Gebilde dar. Skelette von Kollagenfasern und -bündeln

Enteiweißt

REM-Aufnahme

x 21 000



Abb. 35

Reifer Knochen läßt sich bei höherer Vergrößerung als ein Ultraskellettfaser- und bündelartig angeordneter Kugelreihen auffassen

Enteiweißt, luftgetrocknet nach Äther 100 %

REM-Aufnahme

x 50 000

Die in dieser Arbeit angewandte Teilenteiweißungstechnik zielte auf Entfernung der Zellelemente sowie der nicht kollagenen Bestandteile des Knochengewebes, unter Schonung der Kollagenstruktur. Die ultrastrukturelle Darstellung der auf diese Weise behandelten Proben gibt Abb. 36 wieder. Dabei tritt ein ununterbrochenes Bild schnurartiger Gebilde in Erscheinung, die als mineralisierte Kollagenfasern zu interpretieren sind. Die Einzel-fasern ($\varnothing$ 500 - 1500 Å) verlaufen parallel und in Bündeln oder beschreiben in ihrem Verlauf Kurven und Schlingen. Sie besitzen Querstreifungen mit einer Periodizität von ca. 500 Å.

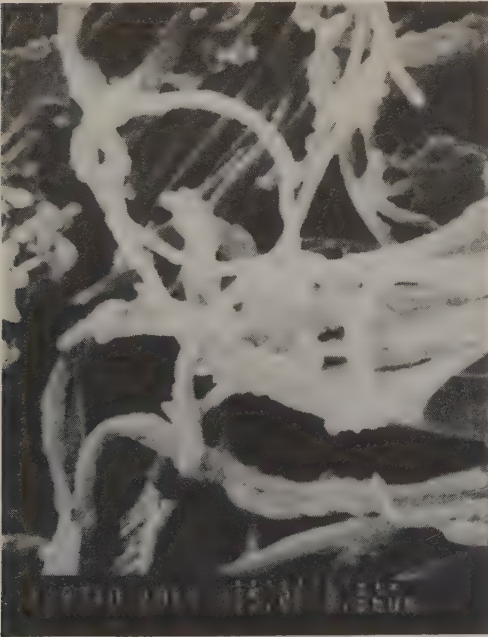


Abb. 36

Das teilenteiweißte Knochengewebe zeigt Kollagenfasern und -bündel. Die Kollagenfasern besitzen Querstreifungen mit einer Periodizität von ca. 500 Å

REM-Aufnahme

x 35 000

Ultrastrukturelle Vergleichsuntersuchungen an Zahnhartsubstanz ergaben die in Abb. 37 - 42 dargestellten Befunde. Bruchflächen von Zahnschmelz zeigen bei niedriger Vergrößerung ein Mosaik unterschiedlich orientierter Mineraldomänen (Prismen). Die Domänen zeichnen sich dabei als optische und strukturelle Einheiten infolge gleichmäßiger Orientierung der die Domäne ausbildenden Strukturen aus. Bei höherer Vergrößerung stellen sich diese Zahnschmelzstrukturen als ununterbrochene Verbände dar. Sie bestehen aus Säulen mit durchschnittlichen Durchmessern von $600 - 800 \text{ \AA}$ (Abb. 37 - 39) oder aus bandförmigen ca. $1200 - 4000 \text{ \AA}$ breiten und $200 - 400 \text{ \AA}$ dicken Salzablagerungen. Die Säulen verlaufen gerade (Abb. 38) oder wie ein lang ausgezogenes S (Abb. 37 u. 39). Zwischen den Mineralverbänden finden sich schlitz- bis spindelförmige Hohlräume mit Durchmessern bis $600 \text{ \AA}$ (Abb. 38 u. 39).

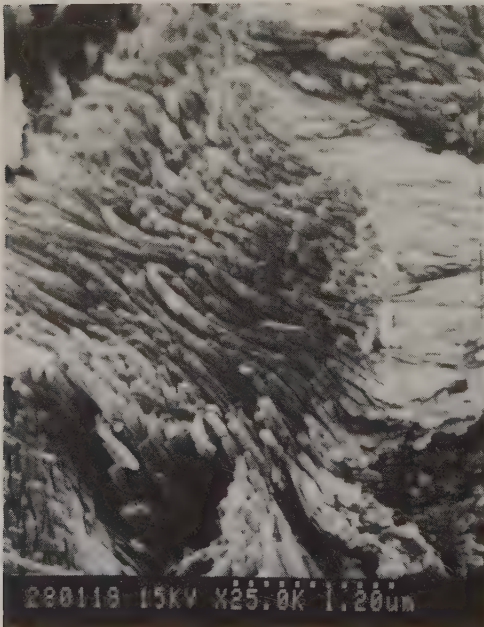


Abb. 37

Struktur eines Schmelzprismas. 600 bis $800 \text{ \AA}$ dicke Säulen (Mitte) und 200 bis 400×1200 bis $4000 \text{ \AA}$ bandförmige Ablagerungen (unten rechts) bilden das Prisma
Bruchfläche
Enteweißt
REM-Aufnahme
 $\times 25\ 000$

Die Säulen- und Bandlänge ist schwer beurteilbar. Ansatzstellen der Säulen und Bänder sind an den Domänengrenzen (Prismengrenzen) zwar zu finden (Abb. 37 rechts unten und Abb. 38 links oben), es zeigen sich jedoch auch scheinbar kürzere Elemente (Abb. 37 u. 38). Einwandfrei können die Bilder jedoch ein Ineinanderübergehen benachbarter Salzmassen nicht ausschließen. Auch Bruchartefakte können Ursache kürzerer Dimension sein.

Säulen- sowie bandförmige Strukturen besitzen einen gemeinsamen untergeordneten Baustein. Dieser besteht in einer sphäritischen Salzablagerungseinheit mit Durchmessern von 200 - 600 Å - durchschnittlich 250 Å. Die Säulen und Bänder zeigen deshalb bei höherer Vergrößerung eine feine granuläre Oberfläche (Abb. 37 - 39).



Abb. 38

Teil eines Schmelzprismas,
in dem die säulenförmigen
Salzablagerungen gerade
und parallel verlaufen
Bruchfläche
Enteilt
REM-Aufnahme
x 40 000



Abb. 39

Detaillierte Darstellung
der Mitte von Abb. 37. Die
Säulen bestehen aus sphä-
ritischen Grundbausteinen
($\varnothing$ 250 Å)

Bruchfläche

Enteweißt

REM-Aufnahme

x 50 000

Abb. 40 stellt die Bruchfläche anorganischen Dentins bei niedriger Vergrößerung dar, die von Dentin-Kanälchen durchzogen wird. Diese weisen unterschiedliche Durchmesser auf. Sie bewegen sich zwischen ca. 0,1 - 1,0 μm , durchschnittlich 0,7 μm . Hier wird bereits deutlich, daß peritubuläres Dentin im Vergleich zu intertubulärem Dentin verhältnismäßig dicht zusammengelagert und seine Bruchfläche glatter ist. Dieser Unterschied wird aus Abb. 41 deutlich. Hier zeigen sich ein Dentin-Kanälchen ($\varnothing$ 0,3 - 0,6 μm) mit dicht zusammengelagerter Salzmasse und eine zwischen den Kanälchen gelegene Porosität. Während Knochen und Zahnschmelz ein unverkennbares ultrastrukturelles Anordnungsmuster der Grundbausteine (Abb. 30, 35, 36, 37 - 39) erkennen lassen, scheinen die hier untersuchten Dentin-Längsbruchflächen eine verhältnismäßig unregelmäßige Anordnung zu besitzen (Abb. 41). Gelegentlich zeigen die gleichmäßig aufgebauten Kanälchen-Wandungen der Abb. 41 Gebilde wie in Abb. 42. Hier finden sich faserförmige, hauptsächlich längs im Kanälchen verlaufende Strukturen ($\varnothing$ 250 - 1400 Å), die beim Betrachten Ähnlichkeiten mit enteweißtem reifem Knochen

(Abb. 34 u. 35) erkennen lassen. Canaliculi vom Durchmesser $0,1\ \mu\text{m}$ (im unteren Drittel der Abb. 42) stellen sich dar.

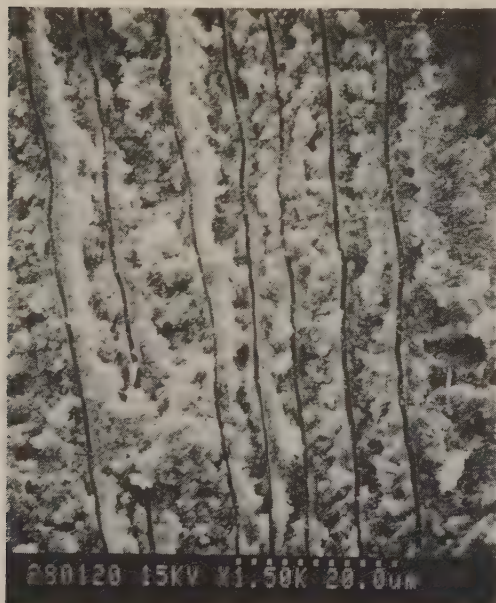


Abb. 40

Dentinmineral bei niedriger
Vergrößerung mit Dentin-
kanälchen

Enteiweißt

Längsbruchfläche

REM-Aufnahme

x 1500



Abb. 41

Darstellung eines Dentin-
kanälchens mit umliegen-
der Mineralmasse

Enteiweißt

Längsbruchfläche

REM-Aufnahme

x 30 000

Auffallend ist in Abb. 41 sowie 42 das sphäritische Erscheinungsmuster der Bausteine. Hier besteht die Mineralmasse wie beim Knochenmineral und Zahnschmelz aus sphäritisch gestalteten Grundbausteinen ($\varnothing$ 200 - 700 Å, durchschnittlich 400 Å).

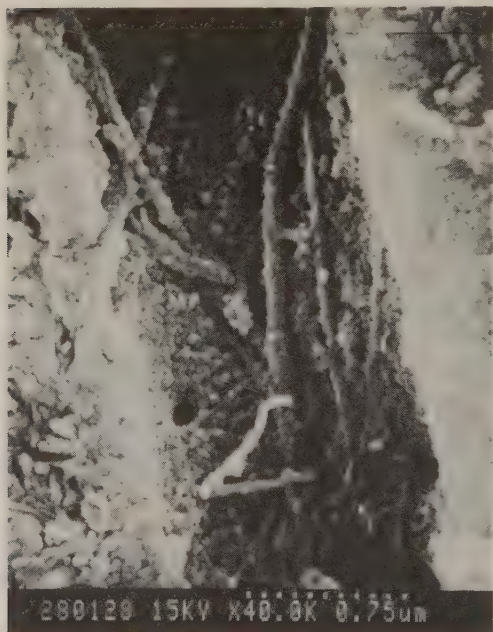


Abb. 42

Darstellung eines Dentinkanälchens mit umliegender Mineralmasse. Die faser- und bündelförmigen Strukturen stellen vermutlich "Skelette" mineralisierten Kollagens dar. Die Grundbausteine ($\varnothing$ 400 Å) der Mineralmasse treten deutlich hervor
Enteilt
Längsbruchfläche
REM-Aufnahme
x 40 000

b) Nach Untersuchung der unterschiedlich behandelten Implantat-nahen sowie -fernen Knochenproben und Überprüfung des Zahnapatits galt es nun, die Grenzzone Hydroxylapatit/Knochengewebe zu werten. Abb. 43 und 44 entstammen der Grenzzone zwischen einem dichtgesinterten HA-Implantat und Knochen nach 6wöchiger Liegezeit. Die Mitte der Abb. 43 zeigt ein teilweise aus dem Implantatgefüge ausgelöstes Riesenkorn. Das Korn läßt sich als Tetraeder vorstellen, bei dem zwei Spitzen in das Knochengewebe hineinragen (nach unten und nach links) während die dritte den Verbund mit dem Implantatkörper hält. Die Grenze des Implantates zieht bogenförmig von der linken oberen Ecke des Bildes zur Mitte des rechten Randes. Keramikstruktur unterscheidet sich vom Knochengewebe durch glatte Oberflächen und scharfe Kanten der einzelnen Keramikkörner. Knochengewebe stellt sich bei den lediglich getrockneten Proben

(3.4.1 a) in Abb. 43 und 44 ohne auffallende Merkmale feinschuppenförmig dar.

Abb. 43

Grenzzone zwischen
Knochengewebe und
dichtgesintertem HA-
Implantat. Knochenge-
webe zeigt kaum struk-
turelle Kennzeichen.
Nicht enteiweißt und
nicht entkalkt, nach
Amylacetat 100 %
luftgetrocknet
Schlifffläche
REM-Aufnahme
x 1500

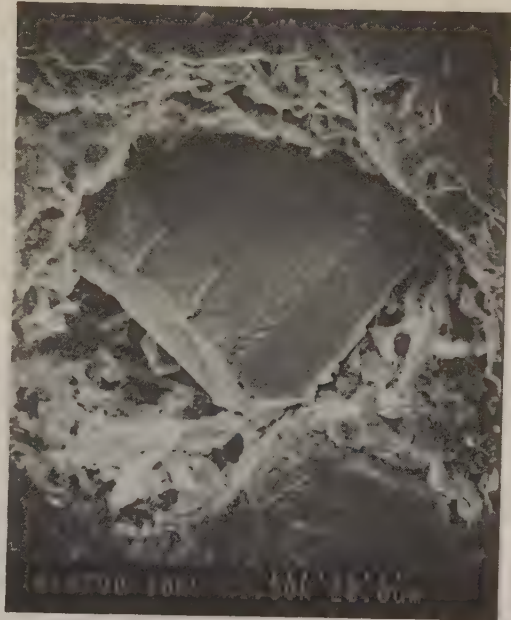
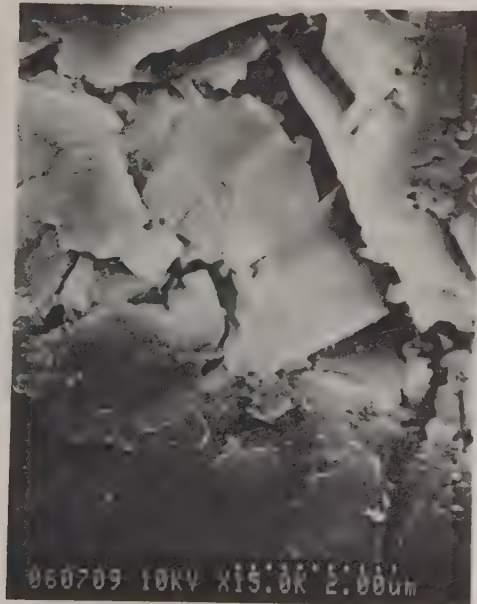


Abb. 44

Grenzzone wie in
Abb. 43 zeigt Lagerge-
webe (unten, dunkel)
und eine Mischung aus
Gewebe und Implantat-
körnern (oben, hell).
REM-Aufnahme
x 15 000

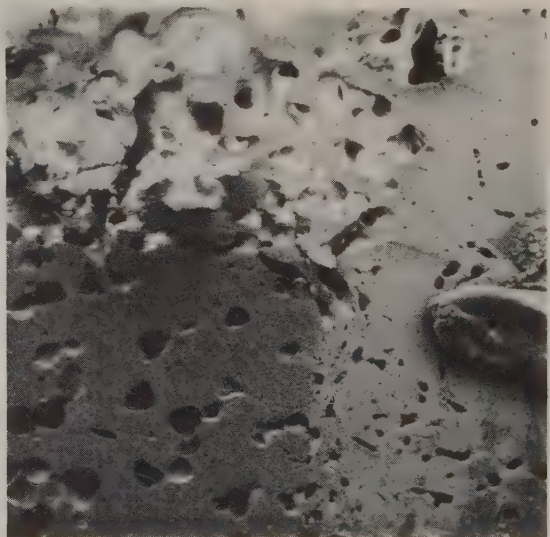


Dieses Fehlen von Identifizierungskriterien blieb bis zu den größtmöglichen Vergrößerungen der benutzten REM-Geräte ($\times 80\,000$) weiterbestehen, auch bei Proben, die speziell mit einer $600\text{ \AA}$ dicken Goldschicht bedampft worden waren. Nur durch unterschiedliche Probenbehandlung (3.4.1) ließen sich besser strukturierte und damit aufschlußreichere Grenzzonen erreichen.

Abb. 45 zeigt in der Übersicht ein poröses HA-Implantat nach 6 Wochen Liegezeit. Das Implantat (dunkel links unten) zeigt Makroporen der Durchmesser $100 - 600\text{ }\mu\text{m}$. Die Schliffebene zieht bei einigen Makroporen durch den interkonnektierenden Bereich. Knochen umschließt das Implantat oben und rechts innig. Oberhalb des Implantates findet sich Spongiosa und rechts Compacta. Zwischen Compacta und Implantat findet sich ein unterschiedlich breiter Streifen ($200\text{ }\mu\text{m}$ bis 1 mm obere Implantatecke) neugebildeten Knochens. Die fingerförmige Struktur am rechten Rand des Bildes ist Leit-C-Plast[®] bedingt (3.4.1 b).

Abb. 45

Übersichtsaufnahme eines porösen HA-Implantates (links unten) nach 6 Wochen Liegezeit
Enteweißt, luftgetrocknet nach Äther 100 %
Schlifffläche
REM-Aufnahme
 $\times 20$



In Abb. 46 und 48 ist die Mitte der Abb. 45 detaillierter dargestellt. Links unten in Abb. 46 erkennt man das Implantat wieder. Von unten nach oben zieht eine Y-förmige Bruchlinie, deren Enden sich im Grenzbereich verlieren. Oberhalb des Implantates liegt ein Netzwerk von Knochenbälkchen, das von einer Vielzahl unregelmäßig angeordneter Gefäß-Kanäle und -Kanalöffnungen durchzogen ist. Immer, wenn das Implantat von spongiosaähnlicher Knochenstruktur umgeben war, traten die Bälkchen massiver und die Hohlräume entsprechend weniger umfangreich auf. Im Gegensatz hierzu trifft man implantatferner auf Spongiosa-Strukturen, bei denen die Bälkchen graziler und die Gefäß- bzw. Markhohlräume deutlich ausgedehnter sind (Abb. 47).

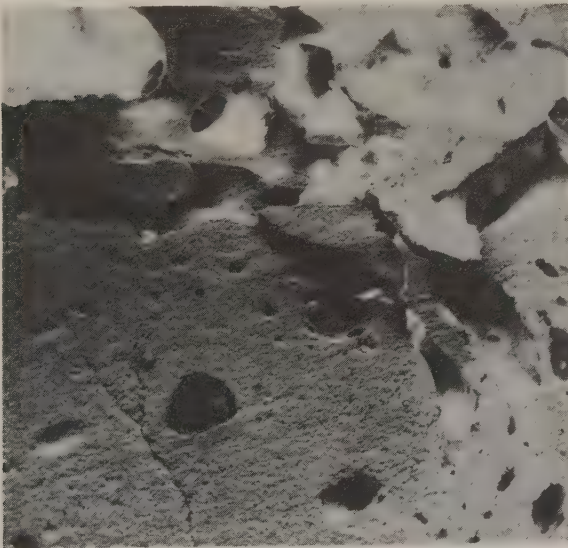


Abb. 46

Ausschnitt-Vergrößerung der Abb. 45 mit größerem HA-Implantat (unten) und anorganischem Knochen (oben u. rechts)

REM-Aufnahme

x 50

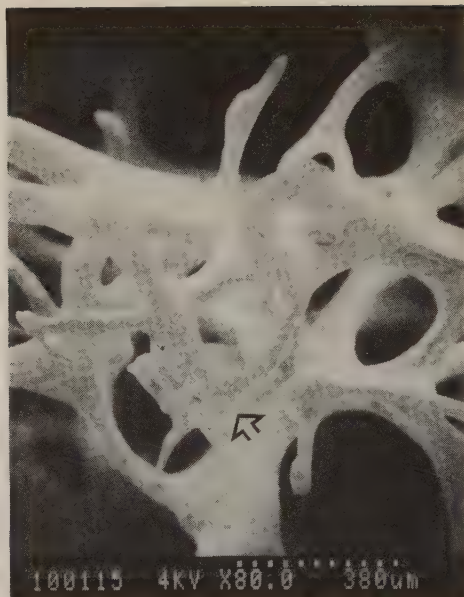


Abb. 47

Übliche Spongiosa-Struktur
aus einem implantatfernen
Bereich. Außer Schleifspu-
ren sind Resorptionsflächen
(z. B. Pfeil) zu sehen
Schlifffläche
Enteilt
REM-Aufnahme
x 80

Histologische Merkmale kommen auch in Abb. 48 und 49 zur Darstellung. Die Mitte der Abb. 46 ist als Ausschnittvergrößerung in Abb. 48 dargestellt. Das HA-Implantat unten, Knochen oben. Rechts unten findet sich eine Makropore ($\varnothing$ ca. 200 μm), die zur Hälfte durch ein Havers'sches System ausgefüllt ist. Das Knochenfragment zeigt einen Hohlraum ($\varnothing$ ca. 60 μm), der organisches Material enthalten haben dürfte. Um den Hohlraum herum wie auch am Boden des fingerförmigen intertrabekulären Raumes in der oberen Bildhälfte finden sich eine Reihe von runden bis elliptischen Höhlen ($\varnothing$ ca. 7,5 bis 30 x 17, durchschnittlich 15 x 7 μm), die Osteozyten-Lakunen vermuten lassen. In Abb. 49 ist ein poröses HA-Keramik-Implantat nach 6 Monaten Liegezeit dargestellt. Knochengewebe in der Form eines flachen Kaktusblattes (hell) füllt die ehemalige Porosität im Implantat aus. Im zugebildeten Knochen sind elliptische Osteozyten-Lakunen ($\varnothing$ 30 x 16 bis 27 x 13 μm) unterschiedlicher Entwicklungsphasen erkennbar. Im oberen Teil ist ein Gefäß-Kanal ($\varnothing$ 13 μm) durch Pfeil gekennzeichnet.



Abb. 48

Ausschnittsvergrößerung der Abb. 46 mit Knochen (oben) und HA-Implantat (unten), in dessen Makropore (rechts unten) ein Knochenmineralfragment liegt.

Schlifffläche

REM-Aufnahme

x 200

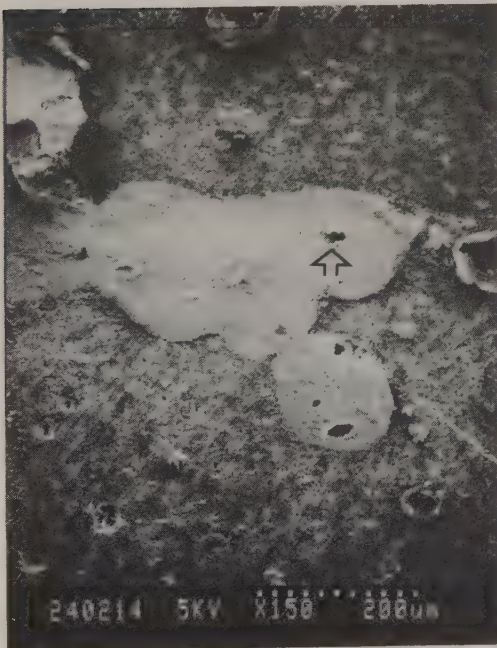


Abb. 49

Poröses HA-Implantat (dunkel) und hineingewachsener Knochen mit Osteozyten-Lakunen und Gefäß-Kanälen. Ein Gefäß-Kanal ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Schlifffläche

REM-Aufnahme

x 150

Als regelmäßiger Befund bei allen Proben fand sich ein enger Kontakt zwischen dem synthetischen Apatit des HA-Implantates und dem biologischen *in vivo* gefällten Apatit des Knochengewebes. Eine Randspaltbildung war auch nach Enteiweißung nicht erkennbar. Dies gilt ohne Rücksicht auf Implantatart (dicht bzw. porös) oder Liegedauer (6 Wochen bis 6 Monate). Abb. 50 stellt eine - durch Bruchgewalt - von anorganischem Knochen befreite Wurzelimplantatoberfläche (Stylus) dar. Den Untergrund bildet das polykristalline Keramikgefüge. Hier zeigen sich Körner mit kleinen bis zu verhältnismäßig großen Flächen. Auf der Keramikoberfläche sind haftengebliebene knöcherne Reststücke (unten, oben rechts und links) zu erkennen. Rechts unten bilden Knochenreste einen nach unten geöffneten Bogen (hell), der auf das enge Anhaften Implantat/Knochen hindeutet.

Abb. 50

Gewaltsam durch Bruch vom Knochenmineral entblößte Oberfläche eines dichtgesinterten HA-Implantates mit Restknochen am Gefüge.

Enteiweißt, luftgetrocknet nach

Äther 100 %

Bruchfläche

REM-Aufnahme

x 2100



Ein ähnliches Phänomen imponiert in Abb. 51. Das den Realkristallen ($\varnothing$ ca. 7 - 20 μm) anhaftende Knochenmineral stellt sich in der Form einzelner oder unterschiedlich dicht zusammengelagerter sphäritischer Gebilde mit Durchmessern bis zu 0,3 μm dar. Die Zusammenlagerungen nehmen verschiedene Gestalt an. Unterhalb der

Bildmitte z. B. befindet sich ein globuläres Gebilde ($\emptyset$ ca. 3 μm) und unten links ist eine Spekulenbildung der Durchmesser ca. 5 x 1,5 μm zu sehen. Die Salzablagerungen scheinen eine Vorliebe für Korngrenzen und andere auf der Implantatoberfläche befindliche Einbuchtungen zu haben (s. auch Abb. 76).

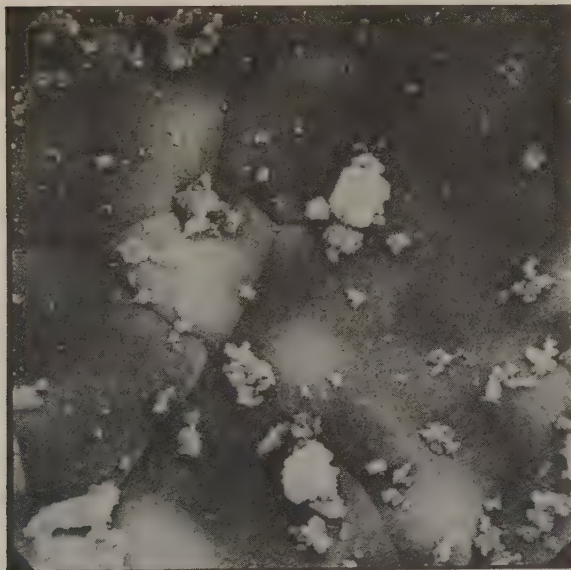


Abb. 51

Boden einer durch Bruchgewalt freigelegten Makropore. Am Implantat sind Knochenmineralgebilde unterschiedlicher Gestalt haften geblieben (hell), die granuläre Oberflächen aufweisen. Enteiweißt, luftgetrocknet nach Xther 100 %
REM-Aufnahme
x 3000

Die Abb. 52 - 56 stellen in Serienvergrößerung einen Bereich des Bodens einer durch Bruch bloßgelegten Implantatpore dar. Abb. 52 zeigt das Keramikgefüge (dunkler, unten) in der Übersicht mit Körnern ($\emptyset$ 4 - 16 μm), Mikroporen ($\emptyset$ 0,7 - 1,5 μm) und Knochenmineral (heller, oben). Die Mikroporen verlaufen hauptsächlich durch die Korngrenzen, doch gelegentlich auch intrakristallin. Auf Abb. 53 kommt ein physikalisch-chemischer Angriff der Keramikoberfläche klar zur Darstellung. Abb. 53 und 54 lassen die Vermutung zu, daß sich Korngrenzen sowie definierte kristallographische Orientierungen bevorzugt auzulösen scheinen. Als Zielscheibe des physikalisch-chemischen Angriffs gelten hierbei außer Korngrenzen die Flächen einiger Kristalle (Mitte Abb. 54) sowie deren Teilbereiche (Abb. 53). Aus Abb. 53 geht auch hervor, daß manche Kristalle sogar ohne sichtbare Zeichen des Angriffs bleiben. In

diesem Zusammenhang sei jedoch auch auf 3.1.2.2 verwiesen, wo eine in das HA eingelagerte β -TCP-Phase beschrieben wurde.

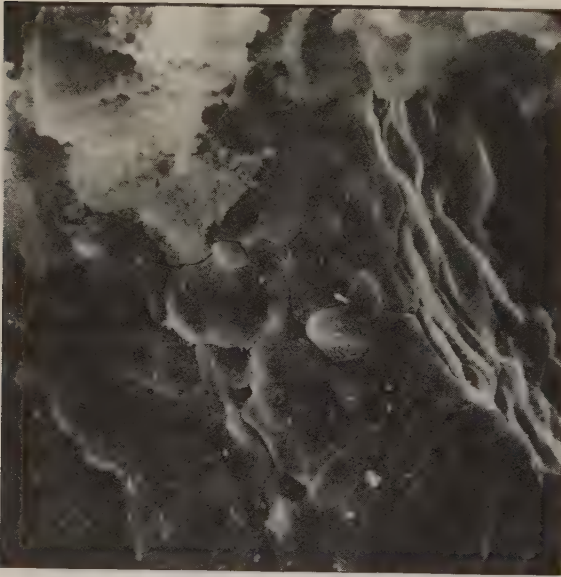


Abb. 52

Übersicht des Korngefüges einer Pore mit Knochenmineral (hell, granulär) nach 6 Wochen Liegezeit.

Enteweißt, luftgetrocknet nach Äther 100 %

Bruchfläche

REM-Aufnahme

x 1300

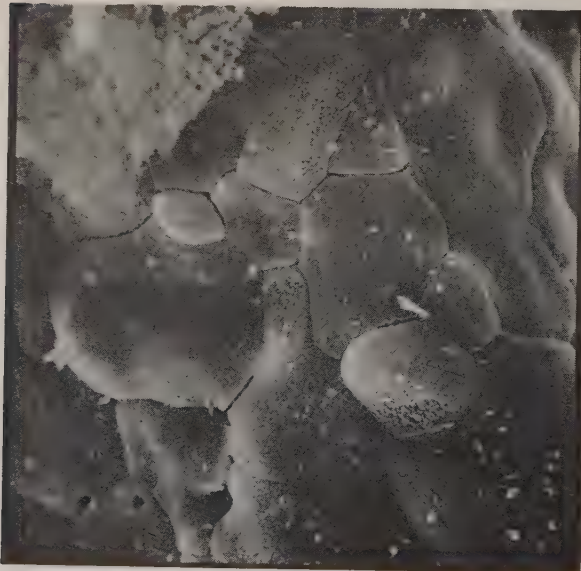


Abb. 53

Ausschnittsvergrößerung der Abb. 52. Physikalisch-chemisch angegriffene Implantatkörner, wobei sich die Korngrenzen sowie definierte kristallographische Orientierungen bevorzugt auflösen scheinen.

REM-Aufnahme

x 2600

Abb. 55 gibt detailliert den in der Mitte der Abb. 55 dargestellten Kristall wieder. Der Lösungsvorgang hat eine Aufrauung des Kristalls (Inhomogenität? β -TCP?) herbeigeführt und Spaltbreiten bis $0,2\text{ }\mu\text{m}$ an den Korngrenzen entstehen lassen. Im aufgerauhten Feld dominieren Spitzen spekulenartiger Strukturen, an denen sich sphäritische Bausteine der Durchmesser bis ca. $400 - 600\text{ }\text{\AA}$ identifizieren lassen. Das Angriffsmuster in Abb. 56 ist im Gegensatz dazu lamellenartig. Auffallend ist hier auch die Ablagerung von biologischem Apatit (weiß, oben) bevorzugt auf vorher physikalisch-chemisch angegriffenen Kristalloberflächen. Abb. 56 entstammt Abb. 52 (links oberhalb der Bildmitte).

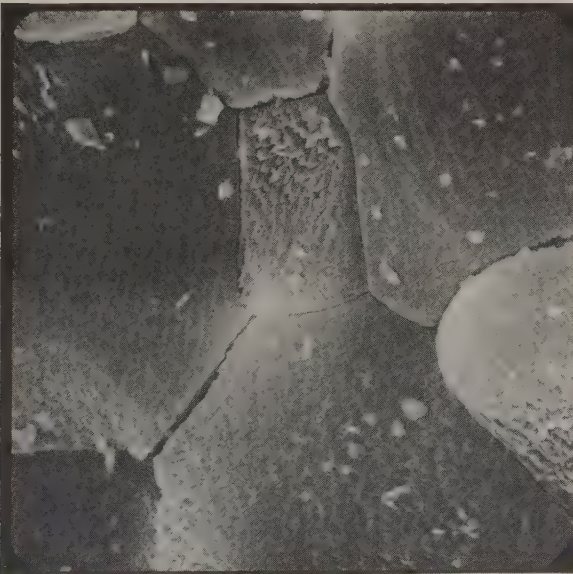


Abb. 54
Ausschnittsvergrößerung der Mitte von Abb. 53 mit angegriffenen Korngrenzen und Körnern.
REM-Aufnahme
x 6500

In Abb. 57 sind außer Mineralclustern drei solcher Kugelketten in der oberen Hälfte des Bildes dargestellt. Die unteren zwei verbinden ein $1,9\text{ }\mu\text{m}$ langes zum Teil knochenmineralbedecktes Kornfragment (links) mit Knochenmineralmasse (rechts). In Abb. 58 sind sie größer dargestellt. Die obere Brückenbildung hat einen regelmäßigen Durchmesser (ca. $780\text{ }\text{\AA}$) und geht nach einem Verlauf von ca. $0,4\text{ }\mu\text{m}$ weitgehend unmerklich in die übrige Knochenmineralmasse über. Die untere weist einen variierenden Durchmesser zwischen 780 und $1200\text{ }\text{\AA}$ auf und läßt sich nach einem freien Ver-

lauf von ca. 0,4 μm noch über 0,5 μm in der Knochenmineralmasse verfolgen.

Abb. 55

Detaillierte Darstellung des mittleren Kornes in Abb. 54.

Das Elutionsmuster zeigt fingerförmige Strukturen, an deren Oberflächen sphärische Grundgebilde ($\varnothing$ 400 - 600 Å) auftreten.

REM-Aufnahme

x 26 000

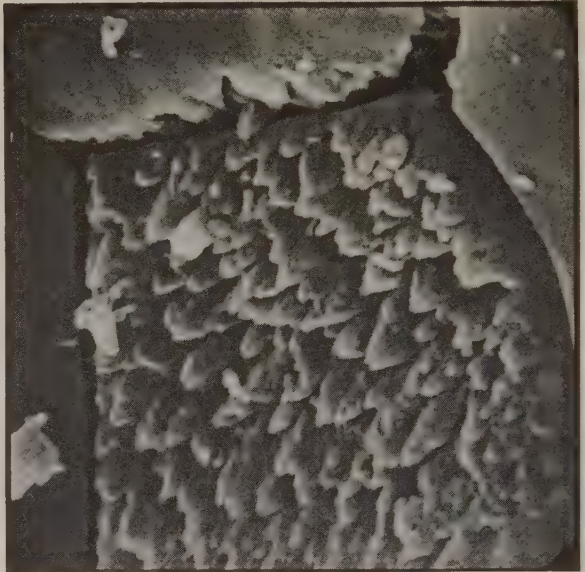


Abb. 56

Ausschnittsvergrößerung der Abb. 52.

Knochenmineral (hell, wolkenartig) hat sich der physikalisch-chemisch angegriffenen Oberfläche aufgelagert.

REM-Aufnahme

x 6500



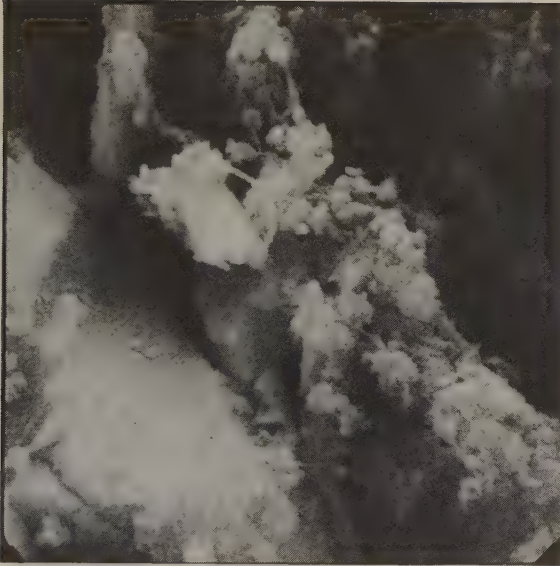


Abb. 57

Die Grenzzone zwischen Knochenmineral (rechts) und porösem HA-Implantat (links) zeigt z. T. angegriffene Korngrenzen, die von knochenmineralspezifischen Salzablagerungen belegt sind.

6 Monate Liegezeit

Enteuißt

Schlifffläche

REM-Aufnahme

x 13 000

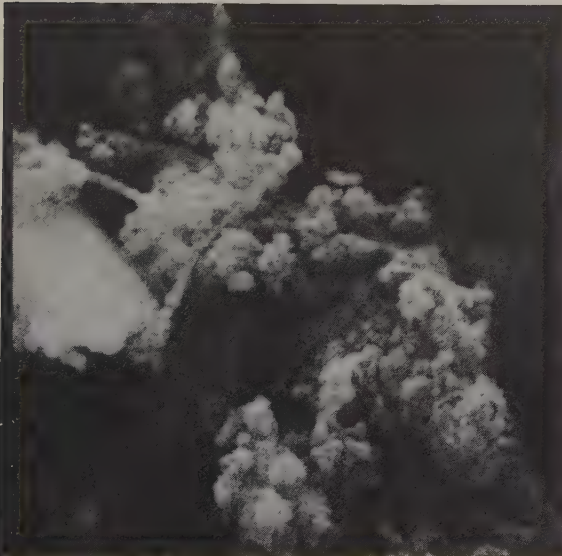


Abb. 58

Ausschnittsvergrößerung der Mitte von Abb. 57. Die kugeli- gen Knochenmineral- gebilde zeigen unter- schiedliche Gestalt sowie Dimensionen und bilden z. T. Kugelnketten.

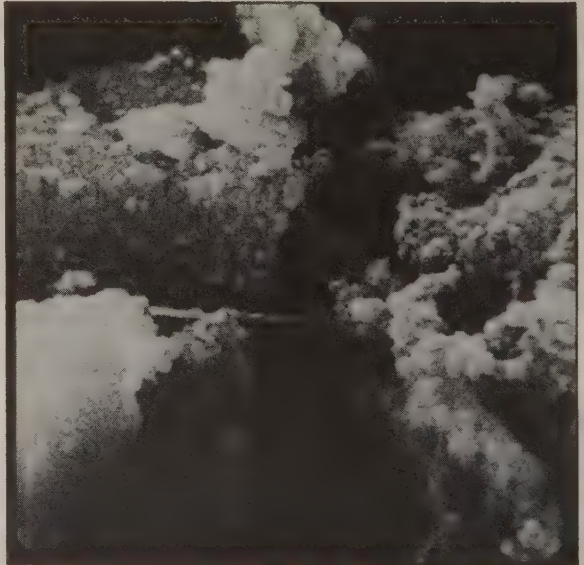
REM-Aufnahme

x 25 000

Das Phänomen wiederholt sich in der Abb. 59, die an anderer Stelle entstammend ist. Hier überspannt eine 400 - 600 Å dicke, 1,4 µm lange lineare Struktur zunächst eine 0,4 µm breite Kluft links bevor sie eine weitere 0,8 µm breite rechts (Bildmitte) überbrückt. Zur linearen Anordnung des Knochenminerals kommt es nicht nur im Kontakt mit Implantatapatit. Sie scheint vielmehr ein Merkmal des Knochenapatits darzustellen, wie dem implantatfernen Knochenmineral der Abb. 60 zu entnehmen ist.

Abb. 59

Eine der Abb. 58 ähnliche Darstellung, an anderer Stelle. In der Mitte überspannt eine Kugelskette zwei von sphäritischen Kristalliten überwachsene Körner und endet in der Mineralmasse (rechts).
REM-Aufnahme
x 25 000



Dort überbrücken ähnliche lineare Strukturen mit Durchmessern von ca. 800 Å und Längen bis ca. 1,3 µm - vereinzelt sowie in Gruppen - die Mineralcluster.

Abb. 61 und 62 zeigen eine derartige "Perlenkette" zwischen zwei Körnern eines dichtgesinterten HA-Implantats nach 6wöchiger Liegezeit und Trypsinbehandlung. Die durchschnittlich 1000 Å dicke und ca. 8000 Å lange Kette hat ihren Ansatz an einem HA-Implantatkorn unten und endet in Verzweigungen ($\varnothing$ 500 - 600 Å) an dem darüber gelegenen Korn. An Ketten- sowie Implantatoberflächen lassen sich Salzaggregate aus sphäritischen Grundbausteinen der Durchmesser 200 - 500 Å identifizieren.



Abb. 60

Grenzzonenferner anorganischer Knochen aus derselben Probe wie Abb. 57 - 59. Das Mineral besteht aus sphäritischen Grundgebilden, die u. a. Kugelketten bilden. Die Ketten stellen vermutlich "Skelette" ausgelöster Kollagenfasern und -bündel dar. Enteiweißt Querschliff x 6400

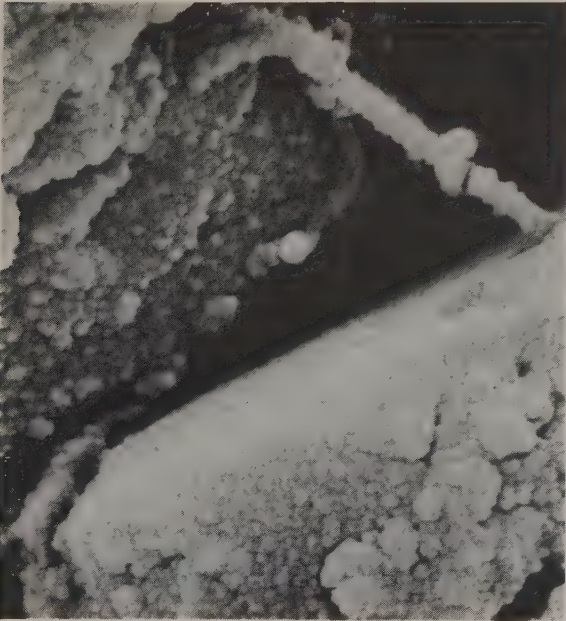


Abb. 61

Grenzbereich Knochen/dichtgesinterter HA nach 6 Wochen. Die Kugelketten lassen Kollagen als Leitgerüst und somit *in vivo* - Entstehung vermuten. Die Aufrauungen der überbrückten Implantat-Körner könnten durch *in vivo* - Fällung wie durch Auflösungs-Umfällungs-Vorgänge infolge Trypsin-Einwirkung erklärt werden. Teilenteiweißt Schlifffläche REM-Aufnahme x 60 000

Die *in vivo* - Herkunft der in Abb. 61 und 62 dargestellten "Perlenkette" kann in Anbetracht der dargelegten Befunde als gesichert gelten. Offen bleibt jedoch die Frage nach Herkunft der Aufrauungen an der Ketten- und Implantatoberfläche. Da die Dimensionen der Grundbausteine hier denen des Knochenminerals entsprechen, könnte es sich bei den Aufrauungen um *in vivo* - Knochenmineralablagerungen handeln. Jedoch läßt sich ein auf das Teilenteiweißungs-Mittel zurückführbarer physikalisch-chemischer Angriff als Erklärung für die Oberflächenstruktur nicht ausschließen (3.4.1 b). Gilt das Letztere, so liegt die Vermutung nahe, daß physikalisch-chemischer Angriff auf HA-Kristallflächen unter anderem feine Gebilde aus untergeordneten Bausteinen mit kleinsten Durchmessern der Größenordnung 200 - 500 Å entstehen läßt.

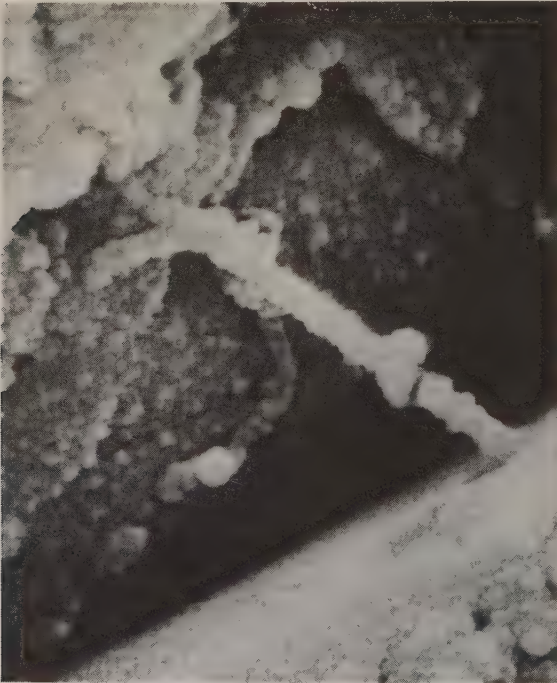


Abb. 62

Ausschnittsvergrößerung von Abb. 61

REM-Aufnahme

x 72 000

Abb. 63 - 65 sind Bruchflächen-Darstellungen einer Grenzzone HA-Implantat/Knochen. Das HA-Keramikkristallgefüge wird an der polygonalen Struktur der einzelnen Mikrokristalle und ihrer Grenzen erkenntlich. In physikalisch-chemisch unangegriffenen Bereichen stellen sich Kristallflächen verhältnismäßig glatt und Korngrenzen ungestört dar. Aus Abb. 63 geht hervor, daß die von dem Angriff relativ verschont gebliebenen Bereiche implantatoberflächen-, mikroporen- bzw. makroporenfern gelegen waren. Unten im Bild kommt ein für HA-Keramik als typisch angenommener Kristall hexagonaler Struktur (diagonal 10 μm) zur Darstellung. Eine Mikropore, möglicherweise ein Mikrokanal ($\varnothing$ 1,6 μm) unfeststellbarer Länge zieht durch die Kristallachse. Die auf der vorderen Kristalloberfläche entstandenen Aufrauhungen lassen die Korngrenze nicht erkennen. Rechts unten und in der Bildmitte treten zerstörte Korngrenzen sowie zum Teil zerstörte HA-Implantatkörner zutage. Hier fehlen die scharfen Kornkanten sowie die linear verlaufenden Korngrenzen. Stattdessen zeigen sich Aufrauhungen unterschiedlichen Grades.



Abb. 63

Grenzzone zwischen
Knochen (oben rechts)
und HA-Implantat
(links und unten)
nach 6 Monaten.

Knochenmineral geht
in Implantatkörner
über, die verschiede-
ngradiger Elu-
tion unterlegen
waren.

Enteilt
Bruchfläche
REM-Aufnahme
x 2500

Knochenmineral (oben rechts) setzt sich aus unterschiedlich dicht zusammengelagerten kugeligen, elliptischen bis wurmförmigen Gebilden der Durchmesser $0,4 - 1,5 \mu\text{m}$ zusammen. In der oberen Hälfte der Abb. 64 - einer Vergrößerung der Mitte aus Abb. 63 - treten die untergeordneten Bausteine ($\varnothing$ bis $1000 \text{ \AA}$) zutage.

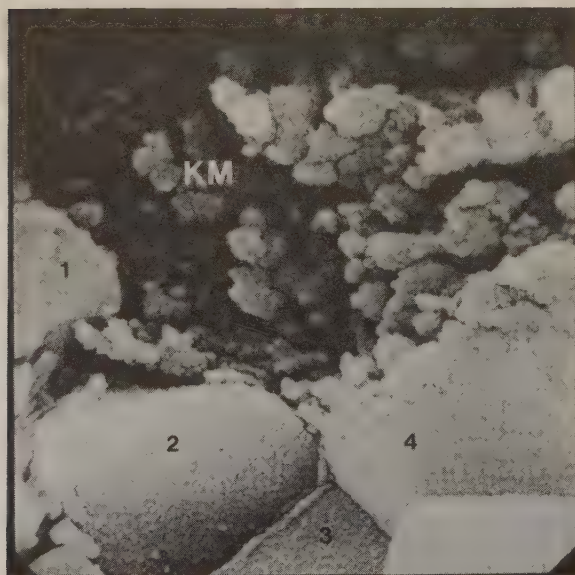


Abb. 64
Beziehung des
Knochenminerals
(KM) zu Implantat-
körnern (1 - 4).
Die dem Kornanteil
(4) aufgelegenen
sphäritischen Ge-
bilde scheinen ihm
selbst zu entstammen.
Ausschnittsvergröße-
rung aus Abb. 63.
REM-Aufnahme
x 10 000

In der unteren Hälfte stehen drei HA-Implantatkristalle (2, 3 u. 4) durch λ -förmige Korngrenzenstrukturen zueinander in Beziehung. Während die Grenze zwischen den Körnern 3 u. 4 bei dieser Vergrößerung weitgehend weiterbesteht, ist die andere durch Apposition kugelig bis kettenartiger Phasen verändert. Besonders auffallend in der Abb. 64 ist der unmerkliche Übergang vom Knochenmineral (oben) in HA-Implantatkörner (unten). Die Grundbausteine ($\varnothing$ bis $1000 \text{ \AA}$) der Knochenmineralcluster lassen sich bis an die HA-Implantatkristallflächen verfolgen. Diese sind dem Knochenmineral zugewandt und scheinen einen Anlösungsangriff erlitten zu haben. Insbesondere bei Implantatkorn 4 scheinen sphäritische Gebilde dem Implantatkristall selbst zu entstammen.

Abb. 65 ist eine Vergrößerung aus der linken oberen Ecke der Abb. 63. Die Grenze zwischen Knochenmineral und Implantat zieht diagonal von links oben nach rechts unten (Implantat unten, Knochen oben). Aus einer verhältnismäßig glatten Oberfläche heraus - unten im Bild - wird das HA-Implantatkorn zunehmend granulär bis schließlich an der Grenze Spekulenbildungen unterschiedlicher Dimensionen in Erscheinung treten. Diese fingerförmigen Strukturen sind - wie in Abb. 55 - von sphäritischen Gebilden der Durchmesser bis $1000 \text{ \AA}$ bedeckt.

Abb. 65

Die Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 63 stellt eine Grenzzone zwischen Implantat HA und Knochenmineral KM dar. Das Implantat ist mit knochenmineralspezifischen Gebilden verwachsen und weist infolge Elutions-Umfällungs-Vorgängen fingerförmige Strukturen auf.

Vgl. Abb. 55

x 10 000



Dargestellt in Abb. 66 - 70 sind Serienaufnahmen eines durch Bruch bloßgelegten Interfaces Knochen /dichtgesintertes HA-Implantat. Das Implantat tritt mit glatter Oberfläche und deutlichen Korngrenzen am rechten Bildrand hervor. Knochenmineralkennzeichnende kugelige sowie elliptische bis spindelförmige Cluster zweier Größenordnungen sind in Abb. 66 zu sehen. Ab dem freiliegenden Implantatanteil zieht eine ca. $3 - 4 \mu\text{m}$ breite Zone vorwiegend kugelig bis spindelförmiger Zusammenlagerungen der Durchmesser

0,9 - 1,8 x 2,7 μm diagonal nach links unten durch das Bild. Die oberen und unteren Anteile beherrschen kleinere, eher kugelige Gebilde der Durchmesser 0,5 μm . In der linken Bildhälfte erscheinen auch unterschiedlich weit eröffnete Hohlräume ($\varnothing$ 9 x 4,5 μm), die in Ausbildung begriffene Osteozyten-Lakunen darstellen können. Die größere, dem Implantat nahegelegene Höhle ($\varnothing$ ca. 20,0 x 6,5 μm) wird in Abb. 67 vergrößert dargestellt. Einzelheiten bezüglich der Gestaltung ihres Bodens sind aus der Abb. 29 ersichtlich.



Abb. 66

Übersichtsaufnahme der Umgebung eines durch Bruchgewalt freigelegten HA-Implantatanteils mit jungem Knochen. Calcosphärite und eine Osteozyten-Lakune sind dargestellt
Enteuiweißt
REM-Aufnahme
x 1100

In Abb. 67 überwiegen bis auf die unteren und oberen Randbereiche größere Knochenmineralcluster (durchschnittlich $\varnothing$ 1,0 x 2,3 μm). Beim Betrachten der Grenze Knochenmineral/HA-Implantat läßt sich feststellen, daß die Implantatapatitkristalle sowohl mit den größeren als auch mit den kleineren Knochenapatitclustern in Beziehung stehen. Abb. 68 zeigt den unteren Bezirk der in den Abb. 66 und 67 dargestellten Grenze Knochenmineral/HA-Implantat. Unten im Bild treten die Faserstrukturen jungen anorganischen Knochenminerals (3.4.3 a) in Erscheinung.

Abb. 67

Ausschnittsvergrößerung
aus Abb. 66. Dichtgesin-
tertes HA-Implantat mit
umliegendem jungem

Knochen

REM-Aufnahme

x 2200

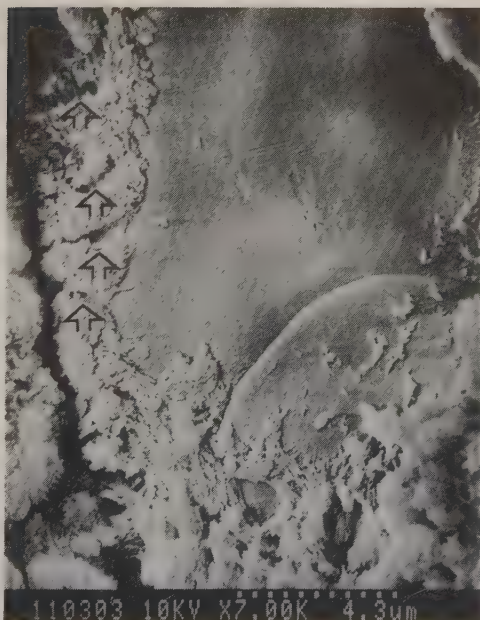


Abb. 68

Höhere Vergrößerung der
unteren Grenzzone
Knochenmineral/HA-Implan-
tat in Abb. 67. Das Im-
plantat steht in unmittel-
barer Beziehung zum regel-
recht strukturierten anor-
ganischen Knochenmineral
(vgl. Abb. 29). Vielzahl
und Lage implantatnaher
Osteozyten-Canaliculi
(siehe Pfeile) weisen
darauf hin, daß ein Osteo-
zyt in unmittelbarer Nach-
barschaft, vielleicht am
Implantat selbst, gelegen hat.

REM-Aufnahme

x 7000



Oben links in der Aufnahme (Abb. 68) eröffnet sich $1,4\text{ }\mu\text{m}$ vom Implantat entfernt ein in Entwicklung befindlicher Canaliculus ($\varnothing\text{ }0,4\text{ }\mu\text{m}$), der über ca. $2\text{ }\mu\text{m}$ in der Knochenmasse verläuft, bevor er hierin verschwindet. Ca. $2,1, 3,9$ sowie $5,6\text{ }\mu\text{m}$ weiter unten befinden sich ähnliche Strukturen, deren kleinste $0,2\text{ }\mu\text{m}$ im Durchmesser mißt. Diese Anreihung von Canaliculi (Pfeilmarkierungen) weist darauf hin, daß ein Osteoblast in der Nachbarschaft gelegen haben wird.

Die Feinstruktur des dem Implantat anhaftenden Knochenminerals wird in Abb. 69 besser dargestellt. Von unten nach oben gehen die dicht zusammengelagerten Mineralcluster stufenweise in ein lockereres Verteilungsmuster zum Implantat über. Generell nehmen die Cluster zahlen- sowie größenmäßig allmählich nach oben ab. In der Ecke rechts unten befindet sich ein tiefergelegener Cluster ($\varnothing\text{ }1 \times 0,4\text{ }\mu\text{m}$). Auf seiner Oberfläche ist eine Reihe längs verlaufender ca. $400 - 850\text{ \AA}$ breiter Furchen erkennbar. Sie sind durch $300 - 400\text{ \AA}$ breite Scheidewände gegeneinander abgetrennt. Im übrigen Bild dominiert ein komplexes Mikroskelett aus geraden bis wurmförmigen Mineralsegmenten, die Verbindung zum Implantatapatit aufnehmen.



Abb. 69

Detaillierte Darstellung der Grenzzone in Abb. 78. Knochenmineralcluster (vgl. Abb. 30) sind mit den HA-Implantatkörnern verwachsen
REM-Aufnahme
x 12 000

In Abb. 70 sind die Mineralsegmente ($\varnothing$ 200 - 600 Å) betonter dargestellt. Daraus geht hervor, daß die Mineralsegmente scheinbar die Kanten dünner Scheibchen (hier $\varnothing$ ca. 2000 - 2400 Å), Plättchen bzw. Scheidewände (hier 2400 - 3400 x 1000 - 2000 Å) darstellen. Im unteren Bilddrittel imponiert der Scheibchen- und Plättchenaufbau zwischen zwei Implantatkörnern, während links unten lediglich Scheidewände zur Darstellung kommen.

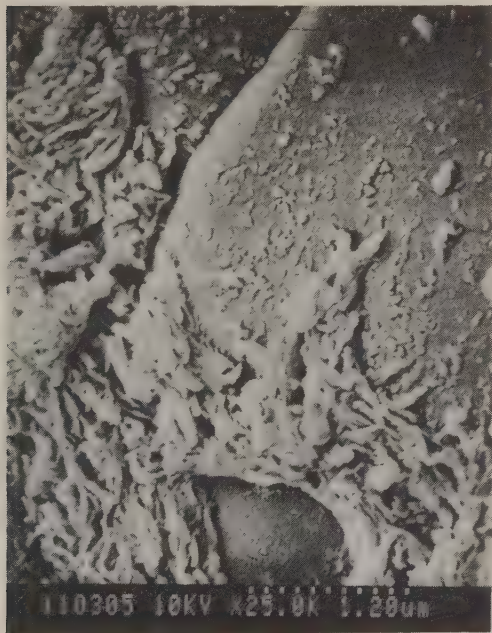


Abb. 70

Die Ultrastruktur des mit den Implantatkörnern verwachsenen Knochenminerals zeigt ein fortlaufendes Ultraskelett nadel-, plättchen- und scheibchenförmiger Gebilde kolloidaler Dimension. Die kleinsten Einzelgebilde haben Durchmesser bis ca. 500 Å und scheinen z. T. dem Implantat zugehörig.

REM-Aufnahme

x 25 000

Auf den Abb. 71 - 73 sind 3 Körner eines vom Implantat abgetragenen HA-Keramikscherben erkennbar, die in angrenzende Gewebe geraten sind. Die Aufnahmen entstammen der Bruchfläche einer teilenteiweißten Probe nach 6wöchiger Liegezeit. Die drei Implantatkörner sind in Abb. 71 mit 1, 2, 3 gekennzeichnet. Der klaren Faser-Darstellung nach zu urteilen, ist die Teilenteiweißung an der oberen Grenze Implantat/Gewebe weit fortgeschritten (Abb. 71 oben u. Abb. 73). Links treten die Fasereinzelheiten noch nicht hervor. Unten wie rechts tritt Faserstruktur kaum hervor (Abb. 71 u. 72).

Abb. 71

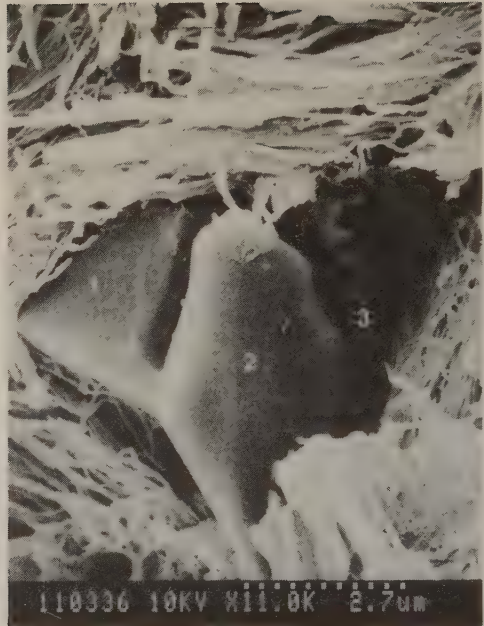
Übersicht der Grenzzone
bei einem in das Gewebe
übergetretenen Implan-
tatanteil mit den Kör-
nern 1, 2 u. 3.

Teilenteiweißt

Bruchfläche

REM-Aufnahme

x 11 000



In Abb. 71 sind Korngrenzen aufgelöst. Die durch Auslaugung entstandene Lücke wird bei Korn 2 durch eine Gruppe zum Teil zusammengelagerter Fasern ($\emptyset$ 400 - 600 Å) überbrückt. Dort, wo der Teilenteiweißungsprozeß nicht weit fortgeschritten ist, scheint der unmittelbare Kontakt Knochengewebe/HA-Kristalle weiterbestehen zu bleiben (Abb. 71 unten, Abb. 72 rechts).

Bei der vorliegenden Arbeit diente Teilenteiweißung der Auslaugung nicht-kollagener Matrix und Zellelementen. In Bereichen, wo der Auslaugungsprozeß bis zur Vollständigkeit verlaufen ist, geht zudem das mit dem nicht-kollagenen Bestandteil zusammenhängende Knochenmineral verloren. Unter der Voraussetzung vorangegangener Mineralisierung besteht somit das teilenteiweißte Gewebe aus Kollagenfasern und Knochenmineral. Implantatnah sowie -fern finden sich Fasern der Durchmesser 400 - 1400 Å (Abb. 73). Diese treten z. T. zu einem Bündelgeflecht ($\emptyset$ ca. 0,2 - 0,5 µm) zusammen. Die Fasern weisen regelmäßig angeordnete Querstreifungen der Periodizität

500 - 600 Å auf. An den Faseroberflächen, zwischen den Fasern und an Faserenden sind immer wieder die für Knochenmineral stehenden sphäritischen Gebilde ($\varnothing$ 200 - 1000, durchschnittlich 500 Å) zu finden. Sie gehen unmerklich in die Faserstrukturen über (Abb. 73).



Abb. 72

Genauere Darstellung der unteren Grenze des in Abb. 71 mit 1 bezeichneten Korns. Kollagenfasern und vermutlich anderes nicht-kollagenes Material sind mit dem Korn verwachsen.

REM-Aufnahme

x 22 000

Faser- sowie Sphäritenstruktur fehlen im vom Auslaugungsmittel nicht durchdrungenen Bereich (Abb. 72 unten). Sie treten jedoch - wenn auch undeutlich - bei unvollständig ausgelaugten Bezirken hervor (Abb. 72 oben). Dieses Phänomen wiederholt sich immer wieder bei dem teilenteiweißten Material und ist u. a. auch in den Abb. 74 - 81 zu erkennen. Die Serienaufnahmen stellen die im Grenzbereich Knochen/HA-Implantat erzeugte Bruchfläche einer teilenteiweißten Probe dar, die 6 Wochen *in vivo* gelegen hatte. Die Einwirkung des Andauungsmittels (Trypsin) teilt das Übersichtsfeld (Abb. 74) diagonal von rechts oben nach links unten. Oben ist eine ausgelaugte und unten eine dichte Hälfte erkennbar. Die glatten Oberflächen der HA-Implantatkörner, ihre scharfen Kanten und linearen Korngrenzen kennzeichnen den Übergang Knochen/HA-Implantat.

Abb. 73

Detaillierte Darstellung
der oberen Grenze des in
Abb. 71 mit 2 bezeichne-
ten Korn. Mineralisierte
Kollagenfasern sind mit
dem Korn verwachsen
(vgl. Abb. 36).

REM-Aufnahme

x 25 000

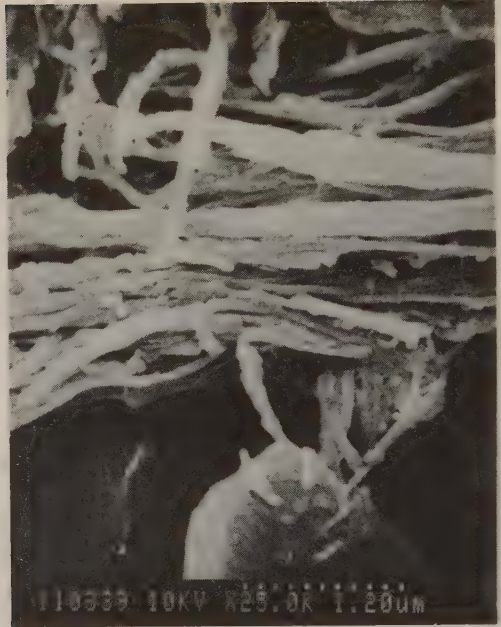


Abb. 74

Übersichtsaufnahme der
Grenzzone zwischen
Knochengewebe (links)
und porösem HA-Implan-
tat (rechts) nach 6
Wochen Liegezeit.

Teilenteiweißt

Bruchfläche

REM-Aufnahme

x 1200



Bei der Interpretation von REM-Aufnahmen müssen stoffspezifische Strukturbezüge - und nicht etwa Helligkeitsgrade - als zuverlässiges Kriterium zur Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Stoffen herangezogen werden. Der Helligkeitsgrad bei REM-Aufnahmen ist lediglich eine Funktion der Sekundärelektronen-Erzeugung. Die Erzeugung von Sekundärelektronen hängt zwar vom Material ab (Metalle erzeugen mehr Sekundärelektronen als Nicht-Metalle). Sie wird jedoch u. a. auch durch die Oberflächenrauigkeit beeinflusst. Dort, wo der Elektronenstrahl steil auftrifft, werden weniger Sekundärelektronen erzeugt, und die Stelle sieht im Bild dunkler aus. Strukturen, die im Elektronenstrahlschatten vor anderen liegen, sehen auch dunkler aus. Zudem sei der sog. "Kanteneffekt" (edge-effect) genannt, bei dem Kanten und strahlenartige Strukturen mehr Sekundärelektronen erzeugen, und demzufolge im Bild heller aussehen (Abb. 77 u. 78). Schon daran scheitert der Helligkeitsgrad als eindeutige Identifizierungshilfe. Diese Kriterien sind bei der Befundung von REM-Aufnahmen zu beachten und dürfen nicht zu Fehldeutungen Anlaß sein.

Einige Körner des in Abb. 74 dargestellten HA-Keramikgefüges besitzen eine raue Oberfläche, was physikalisch-chemischen Angriff vermuten läßt (s. auch Abb. 52 - 56). In der Ecke rechts oben zeigt sich ein in Auslockerung befindlicher hexagonaler HA-Implantatmikrokristall ($\varnothing$ 8,5 μ m). Dieser besitzt einen Kanal unbestimmbarer Länge von 1,5 μ m Durchmesser. Neben den entstandenen Porositäten finden sich durch Teilenteiweißung freigelegte kieselsteinartige Strukturen (Abb. 74). Bei weiterer Vergrößerung stellen sie sich als Implantat-Restkörner unterschiedlichster Gestalt heraus (Abb. 75). Sie halten einen innigen Kontakt zum Restgewebe (Abb. 76). So verbindet ein Geflechtwerk aus Faser- und sphäritischen Strukturen ($\varnothing$ 300 - 1500 Å) zwei Körner 1 und 2 mit drei Fortsätzen (f) eines weiteren HA-Implantatkorns (3). Insbesondere beim linken sowie rechten Fortsatz scheinen die Geflechtwerkstrukturen in das HA-Implantat überzugehen. Hier scheinen die abgelagerten Gebilde den Kristallwachstumslinien (Abb. 12) zu folgen. Die Niederschläge scheinen zumindest zum Teil eine Elutions-Umfällungs-Grundlage zu haben.

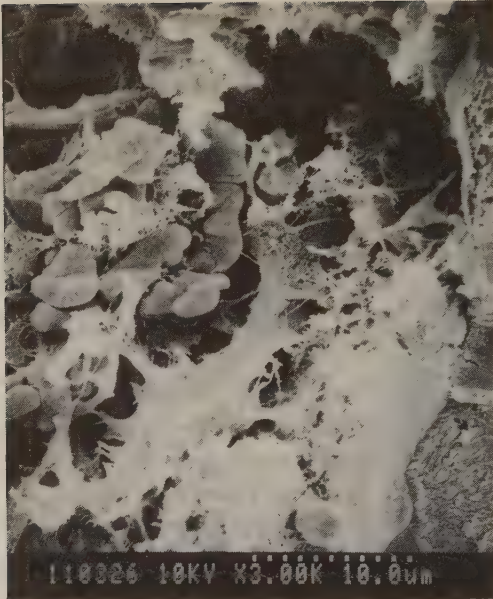


Abb. 75

Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 74. Teilenteiweißtes Gewebe (links) mit kieselsteinartigen Implantat-Restkörnern und HA-Implantat (rechter Bildrand).

REM-Aufnahme

x 3000

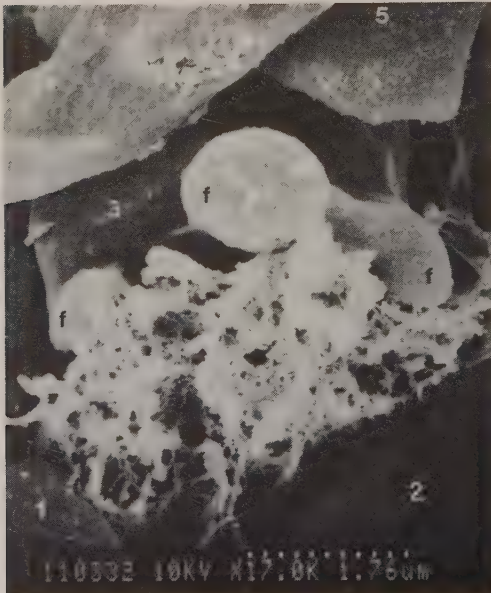


Abb. 76

Grenzbereich nach Teilenteiweißung mit 5 Rest-Implantatkörnern (1 - 5) und Restgewebe.

Geflecht-kollagen verbindet die Körner 1, 2 und 3.

REM-Aufnahme

x 17 000

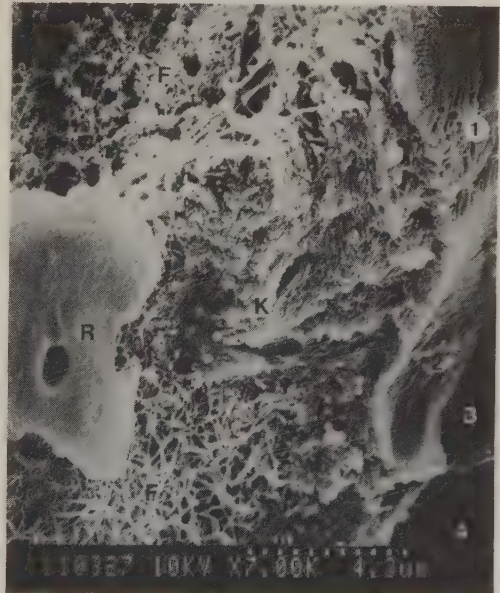
Wie bereits bei lediglich getrockneten Proben festgestellt, läßt sich auch hier in noch unausgelaugten Bereichen der genaue Übergang Knochen/HA-Implantat nicht eindeutig ermitteln (Abb. 77 u. 78). Die HA-Implantatkörner bzw. -teile 1 - 4 in Abb. 77 nehmen einen ca. $1,5 - 3 \mu\text{m}$ breiten Streifen am rechten Bildrand ein. Das rhombusförmige Korn bzw. der so gestaltete Bezirk 1 (längere Diagonale $6,5 \mu\text{m}$) weist vermutlich infolge Elutionsbelastung einen Plättchenumbau auf. Dadurch wird die Grenze dieses Teils zum übrigen HA-Implantat sichtbar. Im Grenzbereich jedoch bleibt die Mikromorphologie zwischen Implantat und nicht ausgelaugtem Knochengewebe kaum unterscheidbar. Die mit einem Loch ($\varnothing$ ca. $0,6 \times 1,0 \mu\text{m}$) versehene helle Struktur (R, längerer $\varnothing$ $8,3 \mu\text{m}$) stellt einen Kornrest dar. Die Einwirkung des Auslaugungsmittels hat teilweise Faserstrukturen (F) freigelegt.

Abb. 77

Beziehungen des Knochenkollagens F und intakten Knochengewebes K zum HA-Implantat

Grenzbereich. Die genaue Grenze zwischen nicht ausgelaugtem Knochen K und den Körnern 1 und 2 läßt sich kaum festlegen. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 74

REM-Aufnahme
x 7000



Der untere Bereich von Abb. 77 ist in Abb. 78 dargestellt. Die Teilenteiweißungsfront ist vom linken Bildrand ca. $2,0 \mu\text{m}$ entfernt und schreitet zu der ϵ -förmigen Grenze fort. Rechts bilden ein helles (oben) und ein schwarzes (unten) Korn die Grenze. Das untere

Korn ist glatt, abgesehen von einem $0,4\text{ }\mu\text{m}$ breiten, mit zotten-ähnlichen Strukturen besetzten Grenzstreifen. Das obere Korn geht besonders deutlich von der Kante (helle Linie) in Knochengewebe über (Pfeilmarkierung). Hier scheinen sowohl das Korn - links von der Kante - als auch das Knochengewebe Ätzeffekte aufzuweisen. Bei beiden sind sphäritische Bausteine der Durchmesser $300 - 500\text{ }\text{\AA}$ auszumachen. Der ausgelaugte Bereich setzt sich aus unregelmäßig angeordneten Faserstrukturen zusammen. Die Fasern weisen durchschnittliche Durchmesser von $600 - 1000\text{ }\text{\AA}$ auf, wenngleich auch kleinere ($\emptyset$ bis $300\text{ }\text{\AA}$) anzutreffen sind. Viele Fasern weisen Querstreifungen auf. Deren Periodizität ist bei dieser Vergrößerung nicht genau zu bestimmen. Sie liegt jedoch zwischen 400 und $600\text{ }\text{\AA}$.



Abb. 78

Darstellung der Grenzzone zwischen Knochen und den in Abb. 77 mit 2 und 4 bezifferten Körnern. Während im teilenteiweißten Bereich (links) Kollagenfasern der Periodizität $400 - 600\text{ }\text{\AA}$ hervortreten, ist intakt gebliebener Knochen mit Korn 2 zu fest verwachsen, als daß die Grenze genau festgelegt werden könnte. Der Pfeil zeigt auf die Kornkante.

REM-Aufnahme

x 15 000

Einen fließenden Übergang zwischen gesintertem HA-Implantat und nachträglich entstandenem Mineral illustriert auch Abb. 79. Links oben befindet sich ein planer (ca. $0,7\text{ }\mu\text{m}$ breiter), gegen den rechten Rand zuspitzender Streifen A, der einen Kornanteil darstellen dürfte. Unten (schwarz) liegt der Anteil eines weiteren bis auf seine scharfen Kanten glatten Korns B. Zwischen beide

Körner ist eine andersartige Mineralphase eingelagert, die *in vivo* gefälltes Mineral vermuten läßt. Sie besteht aus Zusammenlagerungen sphäritischer Gebilde der Durchmesser 250 - 500 Å. Die scharfen Kanten des unteren Korns sind in die Bildung dieser Sphärit-Phase einbezogen. 0,47 µm vor der Spitze wächst die Sphäritphase bogenförmig auf das obere Korn zu.

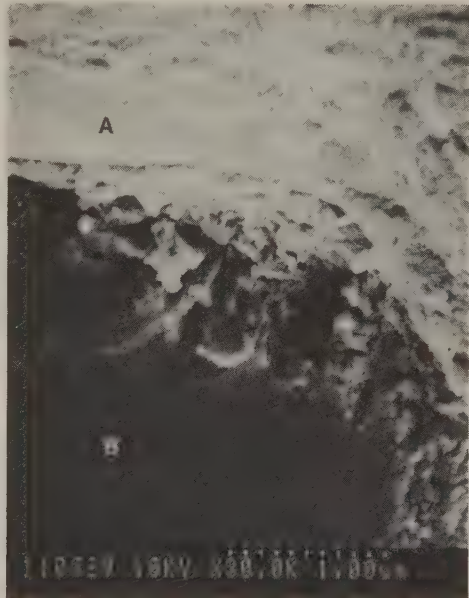
Abb. 79

Grenzzone Knochen/HA-Implantat. Die Körner A und B sind durch *in vivo* gefälltes Mineral verbunden

Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 74

REM-Aufnahme

x 30 000



Die Befunde an teilentkalkten Proben sind in Abb. 80 - 88 dargestellt. Auf Abb. 80 läßt sich der Teil eines aufgelösten porösen HA-Implantates mit umliegendem und eingewachsenem (langer Pfeil) Knochengewebe erkennen. Der Knochen befindet sich in einer intensiven Umbauphase. Dabei ist zu unterscheiden zwischen den Bälkchen B aus Lamellen und Geflechtknochen auf der einen und lockerem intertrabekulärem Gewebe des Knochenmarks auf der anderen Seite. In der Bildmitte erscheint ein Gefäßkanal ($\varnothing$ 100 µm), der ca. 1 mm von der Grenze Knochen/HA-Implantat entfernt liegt.

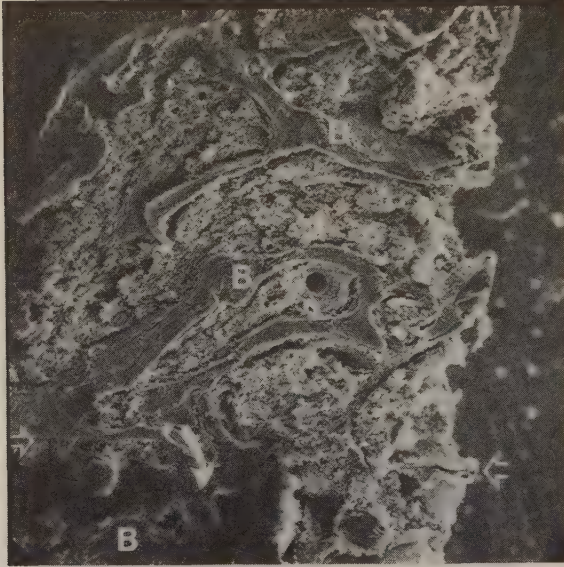


Abb. 80

Die Übersichtsaufnahme einer teilentkalkten Probe stellt die Grenzzone (kurze Pfeile) zwischen Knochen (oben) und einem teilaufgelösten porösen Implantat (unten) dar. In Makroporen ist Gewebe eingedrungen (z. B. langer Pfeil).
Schnittfläche
REM-Aufnahme
x 40

Die Aufnahmen 81 - 83 entstammen dem Bereich unmittelbar links von dem Kanal. Die Gefäßwand (Dicke ca. $2,0\ \mu\text{m}$) geht in eine schwammige Struktur über. Eingemauert in die schwammige Struktur finden sich runde ($\varnothing\ 5 - 6,3\ \mu\text{m}$) bis elliptische ($55 - 6,3 \times 9,3\ \mu\text{m}$) organische Gebilde, die Zellen darstellen dürften. Während kleinere Zellen überwiegend dicht zusammengelagert waren (Abb. 84), treten die größeren einzeln (Abb. 81 - 83) auf. Einige von ihnen nehmen Stechapfelform an, da sie nur teilweise mit ihrer Oberfläche an der Matrix haften (Abb. 81, Mitte). Die meisten sind von einem dichten Faserwerk umschlossen (Abb. 82 u. 83).

Außer den runden bis elliptischen fanden sich im lockeren Gewebe (Retikulum) kleinere Zellen unterschiedlicher Gestalt. Sie sind bikonkav, bikonvex, pyramidal bzw. mehrflächig aufgebaut und besitzen glatte Oberflächen. Sie treten vorwiegend zusammengelagert auf (Abb. 84 u. 85). Gelegentlich treten sie mit den abgerundeten gemeinsam auf (Abb. 86 u. 87). Diese liegen nie einzeln im Retikulum wie die Zellelemente in den Abb. 81 - 83.

Abb. 81

Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 80. In lockeres Gewebe eingemauerte Zellen aus einem Bereich, der 1 mm von der Grenze HA/Knochen entfernt ist.

REM-Aufnahme

x 800

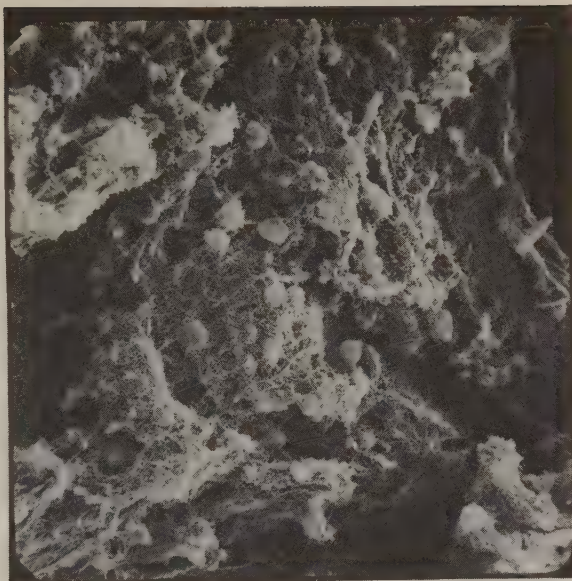
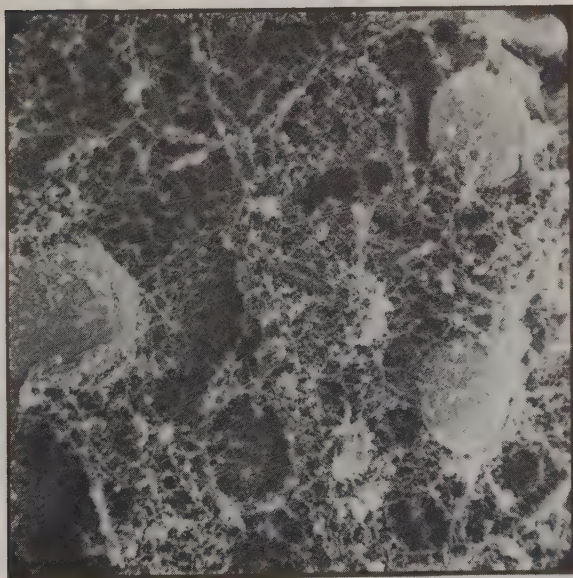


Abb. 82

Ausschnittsvergrößerung aus der Mitte der Abb. 81. Diese Art Zellen tritt einzeln auf.

REM-Aufnahme

x 4000



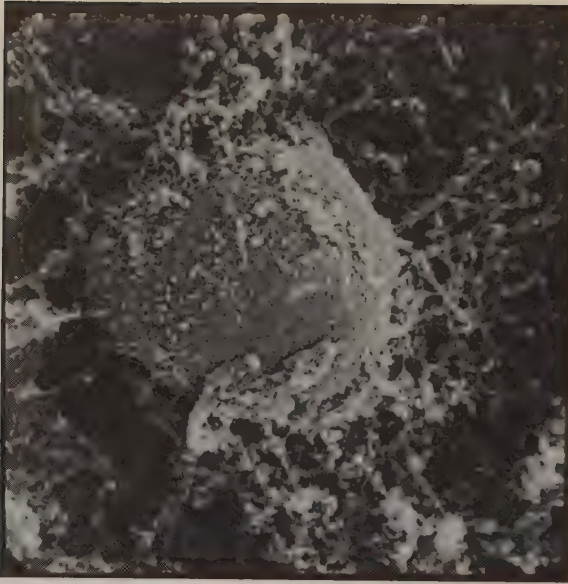


Abb. 83

Einzelzelle vom linken Rand der Abb. 82
REM-Aufnahme
x 8000

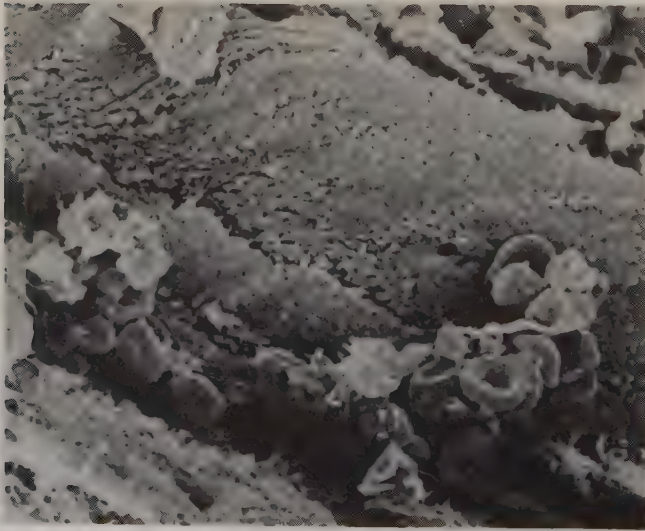


Abb. 84

Remodelling implantatfernen Knochengewebes. Die ehemals verkalkte Knochenschicht ist diagonal von links oben nach rechts unten ausgerichtet. Ober- und unterhalb befindet sich Osteoid. Verbände unterschiedlich gestalteter Zellen. Zelldurchmesser ca. 5 μm . Teilentkalkt, REM-Aufnahme, x 2100

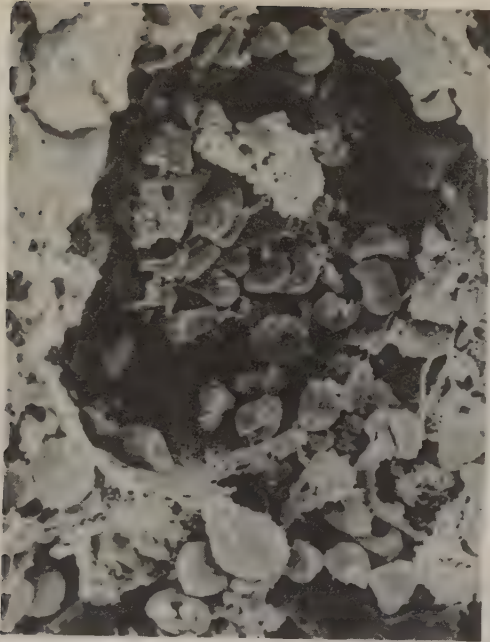


Abb. 85

Remodelling implantatfernen Knochengewebes. Unterschiedlich gestaltete Zellen haften aneinander oder am Matrixsubstrat.
Teilentkalkt
REM-Aufnahme
x 2000

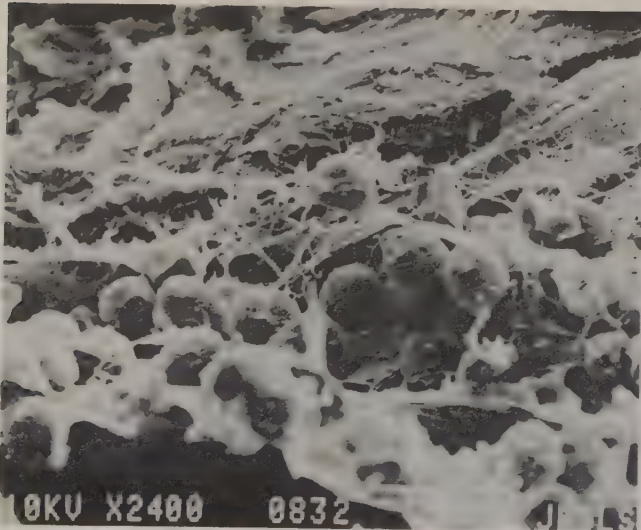


Abb. 86

Remodelling implantatfernen Knochengewebes. Die ehemals verkalkte Kollagenmatrix (oben, dicht) geht in Osteoid (locker, unten) über. Darin ein Gemisch von mehrflächigen und abgerundeten Zellen rauher Oberfläche
Teilentkalkt, REM-Aufnahme, x 2400



Abb. 87

Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 86 mit Kollagenfasern, -bündeln und interponierten Zellen.

REM-Aufnahme

x 4400



Abb. 88

Remodelling implantatfernen Knochengewebes. In dicht zusammenlagerter Matrix von Lamellen- und Geflechtknochen finden sich typische Osteozyten.

Teilentrakt

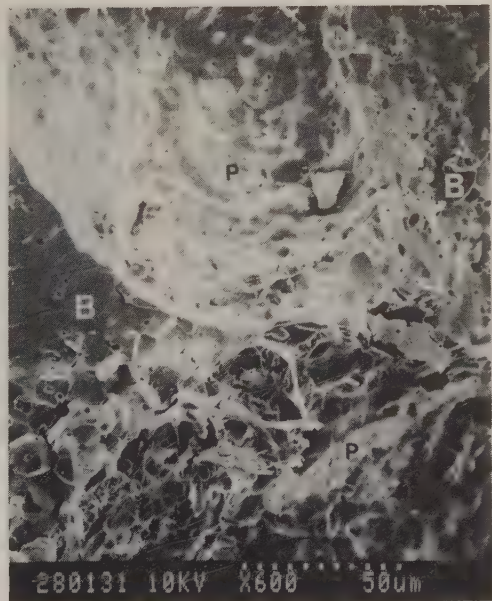
REM-Aufnahme

x 4000

Typische Osteozyten, die in bereits geformten Knochen eingeschlossen sind, wurden ebenfalls angetroffen (Abb. 88). Scheinbar präparatorisch bedingt ist die Osteozyten-Zellwand stellenweise abgerissen. Dadurch liegt das endoplasmatische Retikulum z. T. frei. Ein recht eindrucksvolles phänomologisches Verhalten der Knochenbettzellen gegenüber dem HA-Implantatwerkstoff konnte bei teilweiseweißen Proben beobachtet werden: Zelladhäsion und -ausbreitung wurde auch auf der Werkstoffoberfläche selbst festgestellt (Abb. 89 - 93). In der Mitte von Abb. 89 treffen zwei Bruchflächen (B) und zwei Makroporen (P) aufeinander. Die untere Pore ist durch Knochengewebe ausgefüllt, während die obere bis auf Gewebereste leer ist. Links unten im Bild befinden sich - vermutlich infolge physikalisch-chemischen Angriffs - angelockerte hexagonale Kristalle ($\varnothing$ 8 - 15 μ m). An den Kristallen fallen Mikroporen ggf. Kanälchen ($\varnothing$ 1,5 - 2,5 μ m) auf.

Abb. 89

Übersichtsaufnahme
einer durch Bruchge-
walt erzeugten Ober-
fläche. Zwei Bruch-
flächen (B) und zwei
Makroporen (P) des
porösen HA-Implantates
stoßen in der Bildmitte
aufeinander
Teilenteiweißt
REM-Aufnahme
x 600



An der Implantatoberfläche sind unterschiedlich gestaltete Zellen der Durchmesser 3 - 6 μ m haften geblieben. Diese ordnen sich einzeln (Abb. 90), übereinander (Abb. 91) oder schindelartig (Abb. 93) an.

Der Größe und Form nach erinnern sie an die beim Knochenumbau beobachteten Zellen (Abb. 81 - 87).

Die Abb. 90 zeigt das charakteristische Relief der Implantat-Makropore (s. auch Abb. 12). Rechts unten befindet sich Knochengewebe, innerhalb dessen Knochenlamellen und -bälkchen zu sehen sind. An beiden Seiten der Grenze zwischen oberer und unterer Pore kommen zwei gegenüberliegende elliptische Zellen mit rauher Oberfläche zur Darstellung. Wie die untere Zelle ($\emptyset$ 4,0 x 6,3 μ m) auf einer Knochenlamelle aufsitzt, so haftet die obere ($\emptyset$ 4,3 x 5,5 μ m) dem Keramikgefüge an. Das zackenartige Restgewebe auf dem Gefüge der oberen Pore in Abb. 90 links weist darauf hin, daß ein ehemals fester Verbund zum Implantat bestanden hat.

Abb. 90

Ausschnittsvergrößerung aus Mitte der Abb. 89. In der unteren Pore ist ein zellenenthaltendes Netzwerk von Bälkchen zu sehen. Der oberen Pore haftet Restgewebe an. Der durch Pfeil gekennzeichnete Zellverband ist in Abb. 93 dargestellt.

REM-Aufnahme

x 1500



Flächenförmig und faserartig zusammengelagerte höckrige Strukturen tauchen immer wieder an Implantat- und Zelloberflächen (Abb. 91 u. 92) wie interzellulär (Abb. 91 u. 93) auf. Korngrenzen, Mikroporen sowie Kristallwachstumslinien in Abb. 91 und 92 kennzeichnen das Keramikgefüge (s. Abb. 12 u. 14). Hier wird deutlich, daß das Implantat selbst als Substrat für die Zellen dient.

In Abb. 91 sind 6 der Implantatoberfläche anhaftende Zellen ($\emptyset$ 4,7 - 6,0 μm) dargestellt. Die Zelle 1 besitzt eine raue Oberfläche und stellt sich im Bild - wegen ihrer exzentrischen Lage - unscharf dar. Weiter oben treten zwei z. T. ineinandergelagerte Zellen 2 und 3 in Erscheinung. Zelle 3 faßt auf der implantatnahen Zelle 2 Fuß. Sie lehnt zudem an einer zylindrischen "Stütze" des Durchmessers ca. 1,0 μm (Pfeil) an. Ferner steht Zelle 3 durch das amorphe Material zu der nächsten Zelle (4) in Beziehung. Der Zelle 4 ist die halbkugelförmige Zelle 5 ($\emptyset$ 5,4 μm) aufliegend.



Abb. 91

Ausschnittsvergrößerung aus
Abb. 90.

Die Zellen 1 - 6 haften am
Boden der Implantatmakro-
pore.

REM-Aufnahme
x 5000

Das übrige Bild beherrscht das höckerige Material, das zum Teil die Keramik-Oberfläche abdeckt (Abb. 91). In einigen Bereichen nimmt es eine faserige bis dendritische Verteilung an Implantat sowie an Zelloberflächen an (Abb. 91 u. 92). Daß dieses Material Beziehung zur Zelladhäsion haben könnte, veranschaulicht Abb. 93. Dargestellt sind 4 schindelartig angeordnete Zellen, die auf anderen organischen Strukturen verankert sind. Unter den Zellen zeigt sich eine Faser ($\emptyset$ ca. 0,3 μm), die in dieses Material eingebettet ist. Die Zellen scheinen nicht direkt auf der Faser verankert zu sein. Das amorphe Material stellt scheinbar einen Ver-

mittler dar (Fibronektin?).

Abb. 92

Ausschnittsvergrößerung
aus Abb. 91. Die Zelle 6
der Abb. 91 und umlie-
gendes Material haften
an der Implantatober-
fläche

REM-Aufnahme

x 12 000

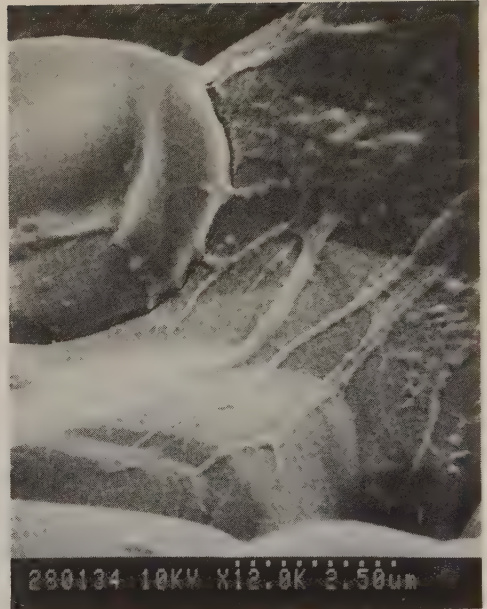
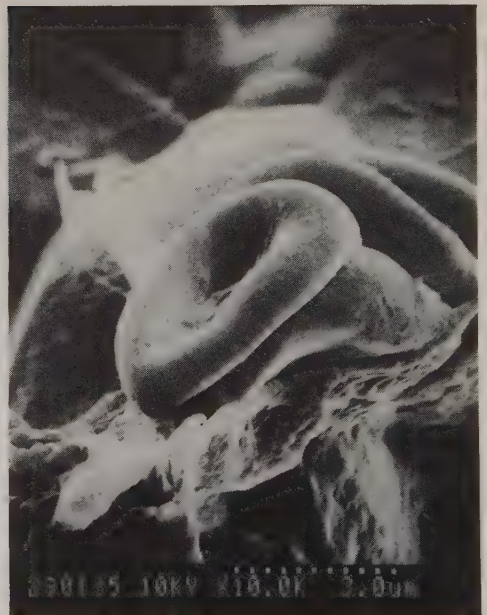


Abb. 93

Ausschnittsvergrößerung
aus Abb. 90. Das amorphe
Material scheint Zellen
und Substrat miteinander
zu verbinden

REM-Aufnahme

x 10 000



3.5 Korrosionsversuche

Den oberflächenreaktiven Implantatwerkstoffen schreibt man beim Hartgewebeersatz die Fähigkeit zu, einen physikalisch-chemischen Verbund mit dem Gewebe eingehen zu können (2.3). Dies soll für Implantatwerkstoffe gelten, die Calciumphosphate enthalten (2.3.1) oder aus Calciumphosphaten bestehen (2.4.4 c). Anhand von Korrosionsversuchen wurde der Frage nachgegangen, ob es zu ultramorphologischen Veränderungen am HA-Implantatwerkstoff kommt, wenn dieses einem Korrosionsmedium ausgesetzt wird. Fernerhin wurde das Medium, in dem die Proben dem Angriff ausgesetzt waren, spurenanalytischen Untersuchungen unterzogen.

Auf diese Weise sollte den Fragen über ursächliche Zusammenhänge zwischen Ultramorphologie und biochemischen Vorgängen nachgegangen werden. Oberflächenreaktiven Implantatwerkstoffen kommt diesbezüglich eine besondere Bedeutung zu.

3.5.1 Präparationsmethodik

Das *i n v i t r o* - Korrosionsverhalten wurde an porösen HA-Implantatwerkstoffen im Anlieferungszustand überprüft. Zwei HA-Blöcke (45 x 15 x 10 mm) wurden mit Diamant-Trennscheiben quer halbiert. Dies geschah bei einer Tourenzahl von 500 Umdrehungen/Min. und einer Vorschubgeschwindigkeit von ca. 3 mm/Min. (3.1.2). Dabei ergaben sich jeweils 2 Proben der Dimensionen 20 x 15 x 10 mm (insgesamt 4). Eine Hälfte wurde jeweils für Korrosionsuntersuchungen herangezogen, während die andere der Kontrolle diente. Alle Proben wurden dann einer Reinigung mit Benzin über 6 Sekunden im Ultraschallgerät (3.1.2.1) unterzogen. Dann wurde ihr Gewicht nach Lufttrocknung bestimmt. Das Wiegen erfolgte mittels Analysewaage (Fa. Mettler) der Präzision $\pm 10^{-6}$ g.

3.5.2 Medium

In einer Vorversuchsreihe mit Vollelektrolytlösung bei 37° über 14 Tage war keine statistisch signifikante Ionenaktivität festzustellen gewesen. Deshalb wurde der pH-Wert mit Trispuffer auf 7,2 eingestellt, die Temperatur des Mediums auf 70°C angehoben und die Liegedauer der Proben auf 4 Wochen verlängert.

3.5.3 Versuchsanordnung

Die beiden Korrosionsproben kamen in 1 l Medium (3.5.2) zu liegen. Das medienenthaltende Glasgefäß wurde entsprechend der Versuchsanordnung in Abb. 94 in ein temperiertes Bad (70°C) eingebracht. Dabei war die Probe an einem Nylonfaden fixiert und so positioniert, daß sie unterhalb des Mediumsiegels zu liegen kam. Das Mediumgefäß war hermetisch verschlossen und mit einem Überdruckventil versehen. Zum gleichmäßigen Wärmeaustausch erhielt das Mediumgefäß einen Magnetrührer und zur Temperaturkontrolle ein Thermometer. Ein Wärmetauscher mit Thermostat hielt das temperierte Bad bei 70°C. Zur Vermeidung von Energieverlusten wurde die Wärmebadoberfläche mit Styroporkugeln beschickt. Das Medium wurde wöchentlich gewechselt und spurenanalytischen Untersuchungen (3.5.6) unterzogen. Nach Versuchsende (4 Wochen) wurden die Proben zunächst über mehrere Tage bei 60°C getrocknet und danach 96 Std. im Vakuum (ca. 10^{-3} Torr) gehalten. Die trocknen Proben wurden dann wieder gewogen (3.5.1).

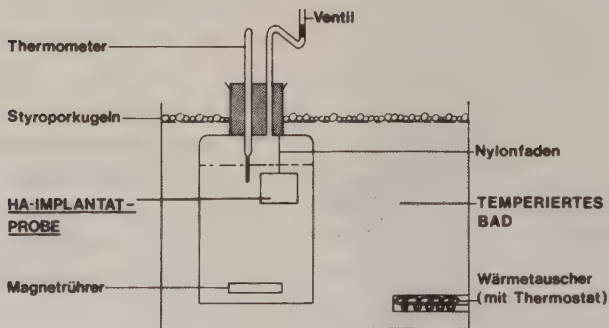


Abb. 94

Graphische Darstellung der Versuchsanordnung - Korrosionsversuch.

3.5.4 Rasterelektronenmikroskopie

Nach dem Wägeprozeß wurden Versuchs- wie Kontrollproben (3.5.1) nach Goldbeschichtung (3.1.1.1) im REM untersucht.

Gerät: Leitz AMR 1 600 T, Auflösungsvermögen $80 \text{ \AA}$ (Herstellerangaben).

3.5.5 Befunde

Beim Vergleichen der Gewichtswerte vor und nach dem Korrosionsversuch ergaben sich bei der Genauigkeit der Analysewaage ($\pm 0,00001 \text{ g}$) keine statistisch signifikanten Unterschiede. Deshalb wird auf Angabe der Gewichtsdaten verzichtet.

Die REM-Befunde sind in Abb. 95 - 97 dargestellt. Es zeigt sich, daß die Oberfläche der Kontrollproben (Abb. 95) bis auf Bearbeitungsunebenheiten glatt erscheint.



Abb. 95

Struktur der Probenoberfläche vor den Korrosionsversuchen

REM-Aufnahme

x 6800

Dagegen haben sich an der Oberfläche der Versuchsproben (Abb. 96 u. 97) sphäritische Gebilde mit Durchmessern bis zu $0,3 \mu\text{m}$ entwickelt. Die sphäritischen Gebilde dürften als Zeichen des Angriffs gedeutet werden können. Diese kolloidale Umwandlung erinnert an

die Erscheinungen bei *in vivo* gelegenen Proben
(Abb. 63 - 65, 69 u. 70).

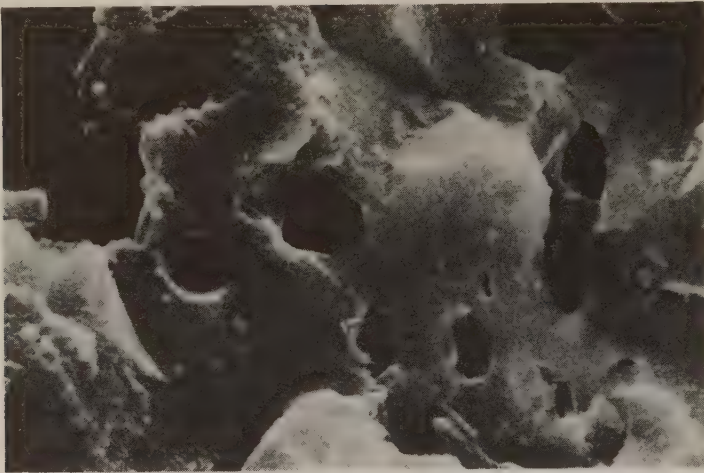


Abb. 96

Struktur der Probenoberfläche nach den Korrosionsversuchen. Die Oberfläche ist infolge eines Elutions-Umfällungs-Prozesses der kolloidalen Umwandlung unterzogen.

REM-Aufnahme

x 6800

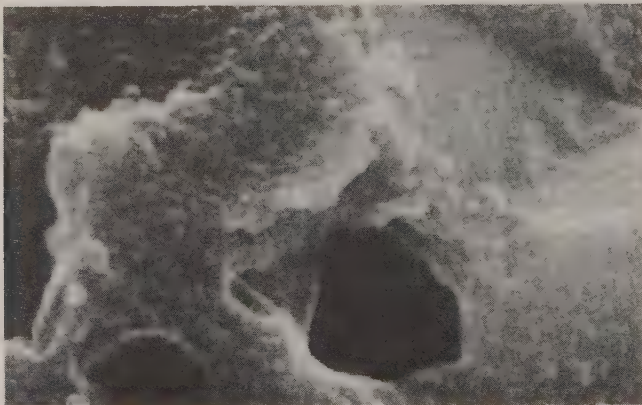


Abb. 97

Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 96. Die Oberfläche ähnelt nach kolloidaler Umwandlung der bei *in vivo* gelegenen Proben.

REM-Aufnahme

x 12 240

3.5.6 Spurenanalytik

Alle 7 Tage war das Medium der zwei Versuchsproben entnommen und gegen ein neues ersetzt worden. Die entnommene Lösung (4 x) wurde mittels ICP (Inductively coupled plasma)-Emissions-Spektralanalyse (SCHRAMM et al. 1982) auf Calcium-, Phosphor-, Zink-, Blei-, Nickel-, Bor-, Mangan-, Chrom-, Magnesium-, Aluminium-, Beryllium-, Kupfer- und Titangehalte analysiert. Die Spurenanalytik erfolgte in der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, Neuherberg.

Die Ergebnisse für Ca^{++} und Pi sind in Tab. 6 wiedergegeben und in den Abb. 98 - 99 dargestellt. Wegen der beschränkten Probenstückzahl (2) und der abgekürzten Versuchsdauer (4 x 1 Woche) kann dem Korrosionsversuch keine abschließende Aussage zugebilligt werden. Dies auch im Hinblick auf spurenanalytische Untersuchungen mit der bekannten Streubreite der Meßwerte. Wenn in dieser Arbeit aus Kostengründen nur 8 Stückanalysen des Korrosionsmediums mittels ICP-Emissions-Spektralanalyse durchgeführt wurden, so darf das Verhalten der beiden Prüfkörper nicht dem des Werkstoffes HA an sich gleichgesetzt werden. Die Analytik zeigt jedoch, daß der Werkstoff im Medium einem Angriff unterworfen war. Dies wird durch REM und Mikroanalytik bestätigt.

Probe	A					B				
	1	2	3	4	gesamt	1	2	3	4	gesamt
Zeit (Wochen)										
Ca^{++} (ppm)	3.285	3.269	3.972	5.536	16.062	9.030	7.033	4.955	5.475	26.493
Pi (ppm)	1.659	1.918	2.495	3.497	9.569	5.044	4.151	3.103	3.314	15.612
Ca^{++} (Mol $\times 10^6$)	8.196	8.156	9.910	13.812	40.075	22.530	17.547	12.363	13.660	66.100
Pi (Mol $\times 10^6$)	5.356	6.192	8.055	11.290	30.894	16.285	13.402	10.018	10.699	50.404
$\text{Ca}^{++} / \text{Pi}$ (Mol)	1.53	1.32	1.23	1.22		1.38	1.31	1.23	1.28	

Tab. 6

Auflösungsdynamik der Proben A und B im Korrosionsversuch (Voll-elektrolytlösung, 70°C, 4 Wochen). Die jeweils nach einer Woche bestimmten Calcium- und Phosphatmengen sind mit den entsprechenden Molar-Verhältnissen angegeben.

Die wöchentlich in Lösung gegangene Calcium- sowie Phosphatmenge steigt bei Probe A kontinuierlich an (Tab. 6, Abb. 98). Dagegen nimmt sie bei Probe B nach starkem Anstieg innerhalb der 1. Woche dann bis zur 3. Woche ab, um danach wieder leicht anzusteigen (Tab. 6, Abb. 99). Mengenmäßig hat Probe A weniger Calcium- sowie Phosphationen als Probe B in Lösung ausgeschieden. Über die gesamte Versuchsdauer ist der Ionenverlust in Probe B 1,6 mal größer (107,93/62,39) als in Probe A.

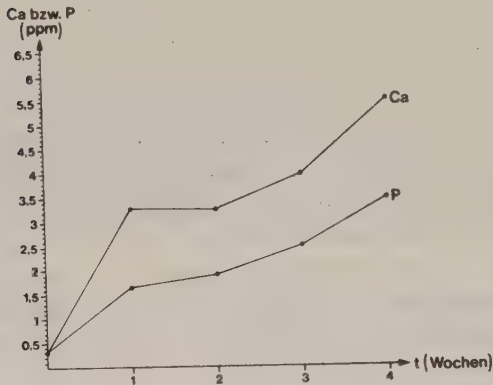


Abb. 98

Graphische Darstellung der in Lösung gegangenen Calcium- (Ca) und Phosphationen (P) bei Probe A in Abhängigkeit von der Zeit.

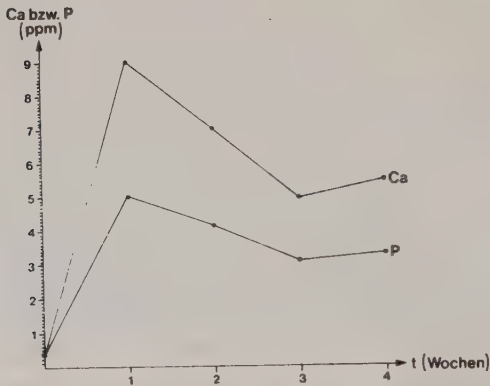


Abb. 99

Graphische Darstellung der in Lösung gegangenen Calcium- (Ca) und Phosphationen (P) bei Probe B in Abhängigkeit von der Zeit.

Trotz unterschiedlichen Löslichkeitsverhaltens nimmt bei beiden Proben mit zunehmender Versuchsdauer das Ca/P-Molarverhältnis in Lösung ab. Das Medium bei Probe A hat nach einer Woche das Verhältnis 1,53. Bis zur 4. Woche sinkt es auf 1,22 ab. Das Verhältnis bei Probe B liegt nach der ersten Woche bei 1,38 und sinkt bis Ende der 3. Woche auf 1,23 ab. Danach steigt es geringfügig auf 1,28 an. Aufgrund der Versuchsbedingungen wurde das Medium jede Woche gewechselt. Nach jedem Mediumwechsel gingen erneut Ionen in Lösung. Es kann deshalb festgestellt werden, daß das Ca/P-Molarverhältnis mit zunehmender Versuchsdauer bis auf ein Minimum (ca. 1,2) herabgesunken ist.

4 Kritik und Auswertung der Ergebnisse

Im Zuge der Aufgabenstellung dieser Arbeit waren zunächst der verwandte Implantatausgangswerkstoff (HA-Pulver, Merck) und dessen Sinterprodukte (HA-Implantatwerkstoff) zu charakterisieren. Dann sollten die sichtbaren biologischen Reaktionen des Lagergewebes auf das Implantat Bewertung finden. Dies vor allem nach morphologischen Kriterien. Lichtmikroskopisch und ultrastrukturell zeigte sich, daß ein in die Hundediaphyse eingesetztes HA-Implantat bereits nach sechs Wochen knöchern integriert ist. Weder histologisch noch ultramorphologisch ist dabei eine bindegewebige Zwischenschicht nachweisbar.

4.1 Charakteristik des Ausgangsmaterials und des Implantatwerkstoffes

Die untersuchten Implantatwerkstoffe sind Sinterware des Rohstoffes Hydroxylapatit-Pulver (Merck). Dieses ist ein feines, weißes Pulver aus Partikeln (Kristalliten) kolloidaler Dimensionen. PEELEN et al. (1977) stellten zwar beim gleichen Pulver "sehr poröse Agglomerate" ($\emptyset$ 1 - 2 μ m) fest. Sie konnten jedoch anhand der spezifischen Oberfläche des Pulvers (59 m²/g) den Rückschluß auf winzige Dimensionen der Grundpartikel ziehen. Die REM-Untersuchung des uns zur Verfügung stehenden Pulvers ergab (3.1.1.2) sphärische Einzelteilchen des Durchmessers 100 - 300 Å. Gelegentlich waren auch nadelförmige Kristallite in der Größenordnung von 1000 - 1500 Å zu finden (Abb. 6). NEWSELY (1966) gibt für gefällte Calciumphosphate eine durchschnittliche Kristallit-Abmessung von 50 Å

(Kleinwinkel-Röntgenstreuung) an. Die dabei durch das TEM erfaßten Strukturen (50 - 500 Å) führt er auf lockere Aggregation kleinerer Einzelteilchen zurück. GMELIN (1961) legt die Kristallitgröße von gefälltem Hydroxylapatit auf 100 Å fest. JARCHO et al. (1976) fanden dafür 200 - 350 Å und geben 200 Å als Mittelwert der Kristallitgröße an. Unsere REM-Ergebnisse über die Kristallit-Abmessungen gefällten Hydroxylapatites (100 - 300 Å) stimmen somit weitgehend mit den Literaturangaben überein.

Bei Herstellung von HA-Implantaten wird der gefällte HA - als getrocknetes Pulver bzw. Bodensatzkuchen (2.4.2 c) - zum Keramikwerkstoff gesintert. Hierunter ist ein Kornneubildungs- und Kornwachstumsvorgang zu verstehen (KIEFFER u. BENESOVSKY 1978). Dadurch entstehen aus dem Fällungsprodukt die hexagonalen Mikrokristallite des Werkstoffgefüges. Diese Umwandlung der kolloidalen Kristallite (im Pulver) in Mikrokristalle (im Werkstoff) bestätigen die Ergebnisse der REM-Untersuchungen an den Sinterprodukten (3.1.2.2). Hier lassen sich Kristalle (Körner) mit Durchmessern von 2 - 16 µm nachweisen. Die ermittelten Werte hängen dabei von Orientierung und Schnittebene der einzelnen Kristalle ab. Die Korngrenzen (Abb. 10 u. 11) sowie Wachstumslinien (Abb. 12 u. 13) stellen weitere Beweise des erfolgten Kristallwachstums dar. Im Durchschnitt weisen die Körner Durchmesser zwischen 5 und 8 µm auf.

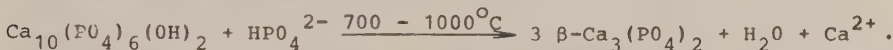
NEWSELY u. OSBORN (1980) geben anhand von REM-Untersuchungen eine Korngröße von 2 - 5 µm an. Auch bei ihnen finden sich jedoch wesentlich größere Kristalle (z. B. in ihrer Abb. 6), die unerwähnt bleiben. Die Festigkeitswerte der Sinterprodukte liegen umso günstiger, je kleiner die Korngröße ist. Deshalb ist der Korngröße Bedeutung beizumessen. Die Korngröße selbst läßt sich durch die Sintertemperatur steuern (JARCHO et al. 1976, RAO u. BOEHM 1974).

Aus der röntgendiffraktometrischen Analyse (3.1.3) lassen sich weitere Rückschlüsse auf Struktur und chemische Zusammensetzung des verwandten Werkstoffes ziehen (3.1.3.2). Das Röntgendiffraktogramm zeigt Reflexe, die für gut kristallisierten HA typisch sind. Die überlagerten β -TCP-typischen Beugungsmaxima berechtigen zu der Annahme, daß dem HA-Implantatwerkstoff auch β -TCP (Whitlockit) beigemischt ist. Synthetisches β -TCP soll sich erst oberhalb 600°C bilden. So dürfte die Entstehung der HA/ β -TCP-Misch-

verbindung durch den Sinterprozeß induziert sein. Dies könnte erfolgen durch Zersetzung des HA bzw. Verlust von Wasser nach:



Wahrscheinlicher jedoch entsteht das β -TCP beim Sintern infolge nicht stöchiometriegerechter Rohstoffe (2.3.2 u. 2.4). Nach NEWSELY (1977) bildet sich z. B. β -TCP bei Anwesenheit von Begleitmonetit und -brushit:



JARCHO et al. (1976) konnten bei Sinterprodukten (Sintertemperaturen $950 - 1190^\circ\text{C}$) aus streng stöchiometriegerechten (1,67) HA-Pulvern keine Umwandlung in β -TCP beobachten.

Entsteht innerhalb eines Kristallgefüges eine weitere "Verunreinigungskristallphase", so ist diese vor allem an den Korngrenzen zu suchen. An den Treffpunkten der HA-Körner könnte eine zweite Kristallphase rasterelektronenoptisch erfaßt werden. Sie bestand aus Körnern, die eine Größenordnung kleiner als die HA-Körner waren (Abb. 9 - 11). Die "Verunreinigungsbereiche" in der Abb. 11 lassen sich zu nächstliegenden einfacheren geometrischen Formen (Dreieck, Viereck, Rhombus) runden, um ihre Gesamtoberfläche grob abschätzen zu können. So nimmt die zweite Kristallphase ca. 13 cm^2 der gesamten Bildfläche (ca. 107 cm^2) ein. Das entspricht 12 %. Dies kann approximativ als chemische Zusammensetzung interpretiert werden. Damit entspricht die Bildfläche in Abb. 11 zu ca. 88 % HA und zu ca. 12 % "Verunreinigungsphase". Selbstverständlich müßte man viele Aufnahmen auswerten, um auf diese Weise einen statistisch repräsentativen Mittelwert der Zusammensetzung ermitteln zu können. Im Hinblick auf die röntgendiffraktometrischen Ergebnisse (20 % β -TCP-Gehalt) dürfte es sich bei dieser zweiten Phase um β -TCP handeln.

Anhand der REM-Untersuchungen und der röntgendiffraktometrischen Analyse kann das untersuchte Material wie folgt charakterisiert werden:

- a) Das zur Herstellung des Werkstoffes verwandte HA-Pulver besteht aus sphäritischen Kristalliten der Durchmesser $100 - 300 \text{ \AA}$.
- b) Durch ein Kristallneubildungs- und Kristallwachstumsverfahren - das Sintern - wachsen die Kristallite zu hexagonalen Mikro-

kristallen ($\emptyset$ 5 - 8 μ m), die das polykristalline Keramikgefüge des Implantatwerkstoffes bilden.

- c) Das HA-Keramikgefüge weist hohe Kristallinität auf, besitzt jedoch eine Inhomogenität, die auf Beimengung von 20 % β -TCP zurückzuführen ist.
- d) Die β -TCP-Kristallphase besteht aus kleineren Kristallen (ca. 10 x kleiner als HA-Kristalle), die vorwiegend in Bereichen postiert sind, wo mehrere HA-Kristalle aufeinanderstoßen.

4.2 Lichtmikroskopie

Nach den geltenden Kriterien steht ein regelrecht in das knöcherne Lager eingebrachte Implantat - abhängig von der Implantatart - mit fibröser Narbe, Chondroid, Osteoid ggf. mit dem Knochen in Kontakt. Es kann aber auch mit dem Knochen einen Verbund eingehen (STRUNZ et al. 1980, GROSS et al. 1981). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß selbst bei optimaler Vergrößerung das Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops nicht mehr ausreicht, um eine schmale, eventuell doch vorhandene bindegewebige Zwischenschicht ausschließen zu können. Demzufolge ist die lichtoptische Differenzierung zwischen Knochenkontakt und -verbund nicht möglich. Die Ergebnisse lichtmikroskopischer Untersuchungen ortsständigen Gewebes sind infolgedessen vorwiegend unter dem Aspekt der Gewebereaktion auf das bzw. des Zellverhaltens zum Implantatmaterial diskutiert.

Bei den eigenen Untersuchungen waren bereits nach 6-wöchiger Liegedauer der HA-Implantate keine Zeichen vom ursprünglichen Spalt zwischen Implantat und Knochenwand erkennbar. Statt dessen füllte neugebildeter Knochen den Spalt aus. Im Bereich von Durchtrittsstellen war knöchernes Gewebe an den Implantaten emporgewachsen. Bei den porösen Implantaten findet sich Knochenbildung auch in den interkonnektierenden Makroporen. Dichte und poröse Implantate waren gleichermaßen im Knochengewebe völlig integriert.

Über Osteointegration bei unbelasteten enossalen Implantaten haben wir bereits berichtet (BAGAMBISA 1984, FISCHER-BRANDIES et al. 1985). Diese Beobachtungen bei unbelasteten Implantaten haben auch andere Autoren mehrfach mitgeteilt. Die Osteointegration gilt dabei sowohl für enossal (KÖSTER et al. 1976, FINN et al. 1980, FRAME et al. 1981) wie für subperiostal eingesetzte HA-

Implantate (DIELERT u. FISCHER-BRANDIES 1984, FISCHER-BRANDIES u. DIELERT 1984).

Die Eingliederung eines Implantates setzt zwangsläufig ein chirurgisches Trauma voraus. Bei Bewertung der Gewebsreaktion sowie des Zellverhaltens zum Implantat muß deshalb der Abheilungsprozeß dieses Traumas berücksichtigt werden. Beim alloplastischen Knochenersatz kann demnach von einer veränderten zellulären Reaktion nur dann gesprochen werden, wenn der Knochenheilungsablauf (2.5.3 u. Abb. 4) durch das Implantat selbst gestört wird. Die kürzeste Liegezeit bei den vorliegenden Untersuchungen betrug 6 Wochen. Zu dieser Zeit waren histologische Zeichen weder von Infektion noch von Inflammation festzustellen. Die Phasen der entzündlichen Reaktion, wie von NERY (1975) beobachtet, waren schon abgelaufen. Bei den eigenen Proben beherrschten lebhaft vor sich gehende Knochenneubildungs- und -umbauvorgänge das Geschehen (Abb. 25 a - 26 c).

In Bereichen, wo die Mineralisierung bereits abgeschlossen ist, sind die Osteozyten von Geflecht- bzw. Lamellenknochen umschlossen (Abb. 25 a, 26 c). Dem Mineralisierungsprozeß entsprechend (2.5) existiert eine Osteoidschicht unterschiedlicher Breite, die den bereits mineralisierten Knochen gegen reifenden Osteoblasten abgrenzt (Abb. 25 b, c). In Übereinstimmung mit den physiologischen histomorphogenetischen und histokinetischen Vorgängen bei postnataler Knochenentstehung (2.5.2, 2.5.3, KNESE 1979, LEBLOND u. WEINSTOCK 1971, OWEN 1971, OSTROWSKI u. WŁODARSKI 1971, RHINELANDER 1972) enthält die Zellpopulation Präosteoblasten, pluripotente Stammzellen, Retikulumzellen, Endothelzellen und Knochenmarkzellen.

Die jeweiligen Zellidentitäten wären auch am vorliegenden Material endgültig zu klären gewesen. Dies jedoch nur durch zusätzliche TEM-Untersuchungen der inneren Zellstruktur.

Die anhand transmissionslichtoptischer Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse berechtigen zu folgenden Aufschlüssen:

- a) das ins Knochenbett eingebrachte HA-Implantat heilt reizlos in das Knochengewebe ein.
- b) Das HA-Implantat erfährt dabei eine Osseointegration und steht in unmittelbarer Beziehung zu Knochengewebe, ohne jegliches

histologisch nachweisbares bindegewebiges Interface.

- c) Das Knochengewebe in unmittelbarer Nachbarschaft des HA-Implantates treibt seine normalen Remodelling-Prozesse ungestört weiter. Das gilt auch für jenes Knochengewebe, welches die Makroporen poröser Implantate erreicht bzw. durchwächst.
- d) Die HA-Implantatoberfläche läßt Wucherung der Stammzellen zu, sowie deren Differenzierung zu Präosteoblasten und weiter zu Osteoblasten. Möglicherweise "fördert" sie sogar diese Abläufe. Dies ergibt sich nicht nur aus der Tatsache, daß implantatnahe Zellen eine normale Morphologie aufzuweisen scheinen. Zudem ist es eine *conditio sine qua non*, daß dem Knochenkontakt bzw. -verbund - wie histologisch belegt - ein Kontakt von Implantatoberfläche und knochenbildenden Zellen vorauszugehen hat.
- e) Bedingt durch knöchernes Ein- und Durchwachsen poröser HA-Implantate entsteht eine Gewebe/Implantat-Komplexstruktur höherer Festigkeit. Die mechanische Festigkeit poröser Implantate nimmt mit abnehmender Gesamtporösität parabolisch zu (2.4.2 c). Die Makroporen der vorliegenden Proben waren bereits 6 Wochen nach Implantation von Lagergewebe belegt. Bei Anwendung der Komplexgefüge-Mechanik (ANDREWS 1980, HARRIS 1980) für das dadurch entstandene Knochen/Implantat-Gefüge ergibt sich eine erheblich erhöhte mechanische Festigkeit der Zweiphasenstruktur. Dies gilt auch dann, wenn die knöchernen Strukturen in den Poren selbst, aufgrund der hier nicht eingeleiteten statischen und dynamischen Belastungen, naturgemäß geringere Festigkeitswerte aufweisen als physiologisch belasteter Knochen.

4.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Ultrastruktur des biologischen Apatits ist zwar seit langem Gegenstand intensiver Forschung, doch auch immer wieder Anlaß zu Diskussionen (2.5). Die Meinungen stimmen jedoch darin überein, daß *in vivo* gefällte Apatitkristallite Abmessungen besitzen, die generell kaum größer als einige Hundert Å sind. Zudem finden sich Einzelmineralablagerungen mit Mikrodimensionen. Dies vor allem in der Mineralisierungsfront von Knochen und Knorpel. Angesichts der beobachteten Dimensionen und Struktur der Knochenmineralcluster scheinen die elektronenoptischen Untersuchungen darauf hinzudeuten, daß biologischer Apatit als eine Zu-

sammensetzung aus primären, sekundären und tertiären Strukturen aufgefaßt werden kann.

So berichtet BOYDE (1972) anhand von REM-Untersuchungen an Geflecht- und Lamellenknochen über Minicalcosphärite der Durchmesser 0,1 - 0,3 μm . SELA u. JAFFE (1977) führten REM-Untersuchungen an heilenden Unterkieferalveolen nach Zahnextraktion bei Ratten durch. Sie stellten dabei bis zu 10 μm lange Spekulumbildungen fest, die aus kugeligen Calcosphäriten der Durchmesser 0,2 - 0,4 μm bestanden.

SELA (1977) beobachtete im neoplastischen Knochengewebe Mineral-Globuli der Durchmesser 1 - 3 μm , die auch aus kugeligen Calcosphäriten ($\varnothing$ 0,1 - 0,3 μm) bestanden. SELA u. BOYDE (1977) kamen zu gleichen Ergebnissen. EGAWA (1980) berichtet über Durchmesser von 0,1 - 0,5 μm . Calcosphärite sind somit ein Merkmal jungen Knochens.

Calcosphärite sind ebenso im REM bei verkalkendem Knorpel identifiziert worden (LESTER u. ASH 1981). Hier scheinen die Calcosphärite größere Abmessungen von 1 μm (BOYDE 1972, FUJIMOTO et al. 1980) bis 1,5 - 2 μm (TAKIGUCHI 1978) zu besitzen.

Bei den vorliegenden Proben lagen abgerundete bis elliptische Calcosphärite durchschnittlicher Durchmesser von 0,8 - 1,8 μm vor. Man sollte bezüglich genauer Dimensionen und Gestalt der Calcosphärite nicht zu dogmatisch sein. Wir haben nämlich in Übereinstimmung mit DEMPSTER et al. (1979) feststellen können (3.4.3), daß Calcosphärite mit der Zeit durch konfluierendes Wachstum an Größe zunehmen, bis sie schließlich im reifen Knochen nicht mehr erkennbar sind (Abb. 34 u. 35).

Bei jungem anorganischem Knochen waren Furchen unterschiedlicher Breiten zu erkennen (Abb. 30, 31, 69). Einzelfurchen (500 - 1200 Å) können als "Abdrücke" des herausgelösten Knochenkollagens interpretiert werden. Die Furchendimensionen sind gut vergleichbar mit denen, die ROBINSON u. WATSON (1955) für Knochenkollagen erwachsener (ca. 800 Å) und älterer Menschen (100 - 1500 Å) angeben. Größere Furchen wurden als Kollagenbündel gedeutet. Die Furchen erwiesen sich durch Mineralwände getrennt, die aus sphäritischen Mineralgrundbausteinen der Durchmesser 200 - 500 Å bestanden. Bei reifem anorganischem Knochen messen die im REM identifizierten Grundbausteine 500 - 1000 Å.

Als kennzeichnend für reifen Knochen erwiesen sich bei teilenteiweißten Proben verkalkte Kollagenfasern (Abb. 36). Anorganischer Knochen läßt sich durch "Kollagenfaserskelette" (Abb. 34 u. 35), die gelegentlich als "Perlenketten" vorliegen (Abb. 57 - 60), charakterisieren. Die Durchmesser der einzelnen Kollagenfasern und -faserskelette bewegen sich zwischen 500 und 1500 Å. Gelegentlich waren kleinere (bis 300 Å) und größere (bis 2000 Å) Fasern vertreten. Die mineralisierten Fasern und die Faserskelette wiesen eine Periodizität von 500 - 600 Å, gelegentlich bis 1000 Å auf.

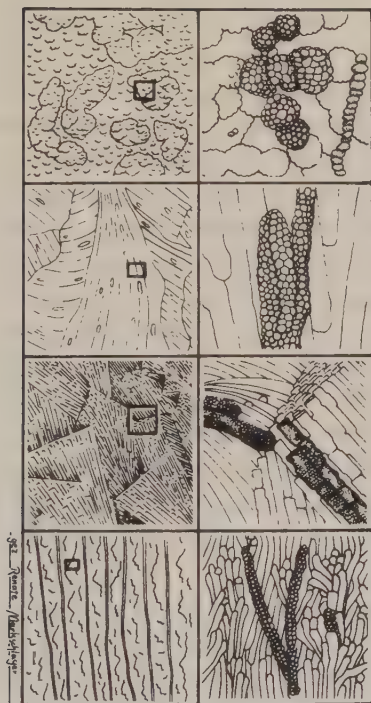
Neben den Calcosphäriten werden bei biologischem Apatit kleinere Einzelgebilde (Å-Bereich) diskutiert. So konnten BOYDE u. LESTER (1967) sphäritische Grundbausteine aus peritubulärem Dentinmineral feststellen. Sie bestimmten anhand der Kohlereplikatechnik ihre Durchmesser mit 250 Å. BOYDE u. HOBDELL (1969 a) wiesen auf ähnlichen Feinbau bei perikanalikulärem, perilakunärem sowie interlamellärem Knochenmineral hin. Wir haben auch bei unseren Proben untergeordnete Mineralgrundbausteine dieser Größenordnung gefunden. Die Sphärite lagen im jungen Knochen ($\varnothing$ 200 - 600, durchschnittlich 500 Å), reifen Knochen ($\varnothing$ 500 - 1000 Å), Dentin ($\varnothing$ 200 - 700, durchschnittlich 400 Å) und Zahnschmelz ($\varnothing$ 200 - 600, durchschnittlich 250 Å) vor. Die ultrastrukturelle Ähnlichkeit der untersuchten *in vivo* gefüllten Apatitarten ist in Abb. 100 schematisch dargestellt.

Die ermittelten mikro- und ultramorphologischen Erscheinungsformen des biologischen Apatits, insbesondere des Knochenminerals, waren zur Abklärung der Beziehungen Knochengewebe/HA-Implantat unerlässlich. Mineralablagerungen mit Größenordnungen, Gestalt und Aufbau wie die in der Literatur angegebenen Spekulenbildungen und Globuli konnten bei schwacher Vergrößerung wiederholt in direktem Kontakt zum HA-Implantat beobachtet werden (Abb. 51 - 53, 56).

Bei stärkerer Vergrößerung wurden immer wieder auf HA-Implantatkörnern abgelagerte knochenmineralspezifische Cluster festgestellt (Abb. 63 - 65). Die Implantatkörner waren zum Teil von Knochenmineral ("Kollagenskelette", $\varnothing$ 400 - 1000 Å) überspannt (Abb. 57 - 62). Teilenteiweißte Proben waren angefertigt worden, um insbesondere die Beziehung des ortsständigen Kollagens zum Implantat abzuklären. Auch hier konnten die in direkter

Abb. 100

Graphische Darstellung der mikro- und ultrastrukturellen Mineralmerkmale jungen Knochens (A), reifen Knochens (B), des Zahnschmelzes (C) und Dentins (D). Auf ultrastruktureller Ebene ist bei allen ein sphäritischer Grundbaustein kolloidaler Dimension nachweisbar.



Beziehung zum Implantat stehenden Kollagenfasern beobachtet werden (Abb. 71 u. 73). Die Fasern waren sowohl quer (Abb. 73) als auch längs (Abb. 72) an die HA-Implantatkörner gebunden (Abb. 72). Zum Teil überbrückten sogar ganze Kollagengeflechtwerke benachbarte HA-Implantatkörner bzw. deren Teile (Abb. 76).

Aus den lichtoptischen und REM-Befunden geht hervor, daß es bei unbelasteten HA-Implantaten im Knochen zu einem innigen Knochenkontakt oder einem -verbund kommt. Anhand von Hochauflösungs-REM-Untersuchungen sollte abgeklärt werden, ob es sich dabei um einen direkten Verbund Knochen/Implantat handelt. Hierzu können folgende Überlegungen als Ansatz gelten:

1) Wie dargelegt, besteht Knochenmineral aus primären sphäritischen

Kristalliten bei mittleren Durchmessern von 200 - 600 Å.

- 2) Dementsprechend dürften bei Zusammenlagerung der sphäritischen Grundkristallite sekundäre Gebilde unterschiedlichster Gestalt entstehen.
- 3) Der verwandte Implantatkörper selbst besteht nach dem Sintern aus hexagonalen Mikrokristallen durchschnittlicher Durchmesser von 5 - 8 µm (4.1). Besteht nun ein Verbund zwischen Implantat und Knochengewebe, so müßte ultramorphologisch nachweisbar sein, daß die Implantat-Mikrokristalle mit den Knochenmineral-Ultrakristallen des natürlichen Knochens und deren sekundären Gebilden verwachsen.
- 4) Zellen benötigen für ihre morphogenetische Tätigkeit ein Substrat, auf dem sie anhaften, wuchern und sich differenzieren können (STOKER et al. 1968, FOLKMANN u. MASCONA 1978). Dies gilt ebenso für osteogenetische Zellen (2.5). Für einen Verbund müßten dann Adhäsion, Ausbreitung und Differenzierung von Knochen- und Knochenmarkzellen direkt auf der HA-Implantatwerkstoffoberfläche gewährleistet und damit auch nachweisbar sein.

Zur Abklärung der Knochenapatit/Implantat-Beziehung wurden Hochauflösungs-REM-Bilder bis zu 80 000-facher Vergrößerung angefertigt. Anhand dieser konnte die Verwachsung zwischen Implantatmikrokristallen und knochenspezifischen sphäritischen Kristalliten ($\varnothing$ 200 - 500 Å) belegt werden (Abb. 77 - 79). Neben einer Verwachsung der HA-Implantatkörner mit den primären Sphärokristalliten konnte ebenso Verwachsung mit strähnen(nadel-)förmigen, plättchen(tafel-)förmigen Mineralablagerungen sowie -aggregaten unregelmäßiger Gestalt nachgewiesen werden (Abb. 70).

Auf die Fähigkeit der Oberflächen synthetischen und natürlichen Apatits, Niederschlag von Calciumphosphaten zu veranlassen und deren Kristallwachstum zu fördern, wurde bereits (2.4.3) verwiesen. Dies findet in metastabilen Calciumphosphatlösungen statt. Dieses als Nukleation beschriebene physikalisch-chemische Phänomen (WALTON 1967) konnte mehrfach mit unterschiedlichen Apatitkeimen belegt werden. So wiesen MEYER et al. (1972) sowie AOBA u. MORENO (1984) das epitaxiale Kristallwachstum der Calciumphosphate auf *i n v i t r o* gefälltem Apatit nach. DOI u. EANES (1984) diente

Zahnschmelz als Kristallwachstumskeim.

Im Hinblick auf solche Erkenntnisse weist die in dieser Arbeit belegte Verwachsung Knochenapatit/Implantatapatit (Abb. 51, 57, 68 - 70, 79) zwingend auf epitaxiales Kristallwachstum hin. Dies nicht zuletzt deshalb, weil epitaxiales Wachstum auch bei *in vivo* - Knochenverkalkung stattfinden soll (2.4.3, 2.5.5). Der Verwachsungsmechanismus der beiden Apatitarten kann deshalb zumindest zum Teil einem Impf-Epitaxie-Komplex zugeschrieben werden.

Eine Diskrepanz ergibt sich jedoch dadurch, daß nicht alle mit HA-Implantatkörnern verbundenen sphäritischen Kristalle, die als knochenspezifisch identifiziert wurden ($\varnothing$ 200 - 700 Å) eindeutig dem Lagergewebe zu entstammen schienen. *In vivo* angegriffene HA-Implantatkörner wiesen nämlich ebenfalls gleiche bzw. gleichwertige Gebilde auf (Abb. 55, 63, 65). Aufgrund dessen war bei solchen Körnern nicht immer eindeutig festzulegen, wo ein angegriffenes Implantatkorn aufhört und wo das Knochenmineral beginnt (Abb. 64, 77 - 79).

Eine *in vivo* angegriffene Implantatoberfläche wird zu den thermodynamisch stabilsten Produkten - den Ausgangsstoffen - zurückgebildet (DIELERT et al. 1981, DIELERT 1982, 1983 a, b). Bei Metallimplantaten z. B. entstehen durch Korrosion Metalloxide. Da die Ausgangsmaterialien keramischer Werkstoffe selbst hochoxidiert sind, ist diese Art von Rückbildung eher unwahrscheinlich. Eine Umkristallisation der beim Sintern entstandenen Kristalle zu Kristalliten, die den Ausgangsstoffen ähneln, dürfte dagegen möglich sein.

Die Untersuchung der Rohstoffe der verwandten HA-Implantate ergab, daß der Werkstoff aus Sphärokristalliten mit Durchmessern von 100 - 300 Å hergestellt wird (4.1). Die sphäritischen Gebilde, die mit den in Abbau befindlichen hexagonalen Implantatkörnern verwachsen sind, weisen Durchmesser ähnlicher Größenordnung (bis ca. 500 Å) auf. Dies kann ein Hinweis darauf sein, daß sich die hexagonalen Implantatkristalle ($\varnothing$ 5 - 8 µm) unter physikalisch-chemischem Angriff einer Rückbildung in Kristallite kolloidaler Dimensionen unterziehen. Dies würde auch die Herkunft der offensichtlich nicht lagergewebeständigen sphäritischen Gebilde, die

mit den Implantatkörnern verwachsen sind, erklären. Der Möglichkeit dieser Interpretation wurde anhand von *in vitro*-Löslichkeitsversuchen nachgegangen (3.5). Dabei legen die REM-Befunde (3.5.5) nahe, daß die Oberfläche der in Lösung eingebrachten Implantatkörner mit sphäritischen Gebilden bewachsen ist. Deren Durchmesser betragen bis zu $0,3\text{ }\mu\text{m}$.

Die Gültigkeit dieser Interpretation würde zu zwei ultramorphologischen Erscheinungsformen der "Verbundzone" Knochenmineral/HA-Implantat führen. Weist ein Implantatkorn keine Umbaukristallite auf, so stehen die Knochenmineralkristallite in unmittelbarer Beziehung zum Korn. Besitzt jedoch das Implantatkorn eine Umkristallisationsschicht aus Abbaukristalliten, so kommt der Verbund Knochenkristallite/Implantatkorn mittelbar über die Abbaukristallite zustande.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den ultrastrukturellen Untersuchungen anderer Autoren ist jedoch nicht ohne weiteres möglich. Die beim Literaturstudium aufgefundenen REM-Untersuchungen schließen vergleichende Interpretationsmöglichkeiten über die Entstehungsmechanismen des Verbundes HA-Implantat/Knochen bzw. Knochenmineral weitgehend aus. Dies insbesondere aufgrund der niedrigeren Vergrößerungen des dort wiedergegebenen Bildmaterials. Bei TEM-Untersuchungen hingegen ergeben sich wegen der Sprödigkeit keramischer Werkstoffe (2.2) präparatorische Schwierigkeiten. Ferner konnten bisher die kausalen Zusammenhänge und zeitlichen Abläufe der *in vivo*-Apatitfällung nicht abschließend geklärt werden (2.5.5).

Trotz der aufgezeigten Problematik wurde in dieser Arbeit auf TEM-Untersuchungen anderer Autoren zurückgegriffen, weil nur diese vergleichbare Vergrößerungswerte aufweisen.

Anhand von TEM-Untersuchungen an entkalkten bzw. mit Ionen-Dünnung behandelten Proben berichten verschiedene Autoren über eine "Verbundzone" zwischen HA-Implantat und kollagenfaserhaltigem Knochengewebe. JARCHO et al. (1977) beschrieben eine azelluläre Verbundzone zeitabhängiger Breite. Sie beträgt nach wenigen Wochen $3 - 5\text{ }\mu\text{m}$ und verringert sich auf $500 - 2000\text{ }\text{\AA}$ bei einigen Monaten. KAY et al. (1978) beschreiben eine Verbundzone aus implantatoberflächengebundenen, palisadenartig angeordneten Kristallen

biologischen Apatits. Diese weisen eine Länge von 600 - 1200 Å auf. Nach diesen Autoren enthält die Verbundzone keine Kollagenfasern. DENISSEN et al. (1980b) kamen zu dem Ergebnis, daß diese amorphe Schicht eine Breite von "praktisch Null" bis 1000 nm aufweist.

Die TEM-Untersuchungen lassen bezüglich Ultramorphologie und Ausdehnung der Verbundzone keine abschließende Beurteilung zu. Auch die Zeitabhängigkeit ihrer Ausbildung bleibt unklar.

Beim eigenen Material fanden sich zunächst mikroskopische Belege für einen Implantatangriff. Dieser manifestierte sich in Körnern, die aus dem ursprünglichen Implantatkörper gänzlich herausgelöst worden waren. Sie hatten sich bis zu mehreren µm entfernt und waren in das im Umbau befindliche Implantatlager integriert (Abb. 75). Einige Einzelkörner hatten sogar die Merkmale des hexagonalen Habitus verloren.

Die Hochauflösungs-REM-Untersuchungen belegten nun zwei Erscheinungsformen der Verbundzone. Einmal standen die Knochenkristallite in unmittelbarer Beziehung zu den Implantatkörnern. Hier setzten implantatgebundene Kollagenfasern senkrecht (Abb. 71), schräg sowie parallel (Abb. 72) an den Implantatkörnern an. Dabei weisen Zellausläufer-Canaliculi und ihr Verlauf darauf hin, daß die zugehörigen Osteozyten dem Implantat sehr nahe angelegen haben müssen (Abb. 67). Das mit dem Implantat verbundene Knochenmineral besteht aus 200 - 600 Å dicken nadelförmigen Strukturen unterschiedlicher Länge. Scheibchen ($\varnothing$ 2000 - 2400 Å), Plättchen und Scheidewände (2400 - 3400 x 2000 Å) sowie unregelmäßig dimensionierte und gestaltete Mineralablagerungen sind ebenfalls nachweisbar (Abb. 70). Diese morphologisch unterschiedlichen Salzgebilde bestehen ihrerseits aus gleichartigen knochenmineralspezifischen Sphärokristalliten der Durchmesser 200 - 600 Å. Diese Erscheinungsform der Verbundzone scheint nur für physikalisch-chemisch nicht angegriffene Implantatkörner zu gelten (BAGAMBISA 1985, DIEBERT et al. 1985).

Das zweite Erscheinungsmuster der Verbundzone läßt sich mit dem *in vivo* - Angriff auf die Implantatkörner in Zusammenhang bringen. Durch diesen physikalisch-chemischen Vorgang waren - wie bereits erörtert (3.4.3) - die Korngrenzen sowie definierte kristallographische Orientierungen einiger Körner der Auflösung an-

heimgefallen. Hier kommt der Verbund mit regelrecht strukturier-tem Knochen über eine Schicht von Umbaukristalliten kolloidaler Dimensionen zustande (Abb. 63 - 65). Dieser Implantatkornumbau-bereich könnte die in der Literatur beschriebene "amorphe Ver-bundzone" erklären. Die Breite der "Verbundzone" würde dann von der Ausdehnung des interponierten Kristallumbaubereiches abhängen.

Hinsichtlich der Intensität der "Korrosionsabläufe" machen sich GROSS et al. (1981) Gedanken darüber, warum der Angriff auf Glas-keramik-Implantate nur bis zur Entwicklung von Chondro- und Osteoblasten erfolgt und dann sistiert. Bei den eigenen Proben liegen die aus dem Implantat gänzlich herausgelösten Körner in-folge Interposition zugebildeten Gewebes (Abb. 74 u. 75) z. T. mehrere μm vom Implantat entfernt. Die korrosionspartikelfreie Zone kann ein Hinweis auf abgelaufene und nun unterbrochene "Korrosionsabläufe" sein.

Die "Korrosion" hat sich zumindest im Mikrobereich eingestellt. Eine Erklärung für den Korrosionsabbruch bzw. dessen Einschrän-kung dürfte in der Knochenheilungskinetik der ersten Postimplan-tationstage zu suchen sein. Dies insbesondere wegen der Anfällig-keit von HA- und Glaskeramiken gegenüber saurem Milieu.

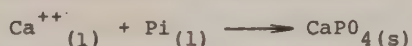
Die Korrosion von Ca-PO_4 -haltigen Gläsern und Glaskeramiken er-folgt durch Aufnahme von H^+ -Ionen (HENCH u. PASCWALL 1974). Im sauren Milieu löst sich HA oder wird zu CaHP_4 (Monetit) bzw. $\text{CaHP}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Brushit) aufgeschlossen (GMELIN 1961). Die Reaktio-nen hängen von der Säurekonzentration ab. So steigert sich z. B. für jede pH-Wertabnahme um eine Einheit die HA-Solubilität um das 6-bis 10-fache (DRIESSENS 1983). Nach BELL u. MIKA (1979) ist die HA-Löslichkeit bei pH 5,19 um das 45-fache größer als bei pH 7,36. Nach BECHTOL et al. (1959) ist der pH-Wert 3 Tage nach Entstehung einer Fraktur vom physiologischen Wert 7,4 auf 5,2 herabgesunken. Das gleiche gilt für die Osteotomie (2.5.3). Der pH-Wert normalisiert sich dann innerhalb einer weiteren Woche.

In den ersten postoperativen Tagen ist das HA-Implantat einer aggressiven Umgebung ausgesetzt. Während dieser Zeit kann das Implantat unterschiedlich stark angegriffen werden. Dies würde die Entstehung der bei den eigenen Untersuchungen beobachteten herausgelösten Körner (Abb. 76) erklären. Mit zunehmender pH-

Normalisierung wird sich die Elution verringern. Da auch herausgelöste Körner in den Prozeß des Knochenremodelling einbezogen werden (4.2), können sie weit in das umliegende Gewebe gelangen. Unwesentlich ist dabei, ob die Körner einem weiteren ultrastrukturellen Abbau unterworfen sind (Abb. 76), oder ob sie davon verschont bleiben (Abb. 71 u. 72).

Bezüglich der Entstehung des Verbundes Knochen/HA-Implantat ziehen HENCH et al. (1971) chemische Mechanismen in Erwägung. Sie messen dabei dem epitaxialen Kristallwachstum große Bedeutung bei. KAY et al. (1978) vermuten, daß für die Entstehung des Verbundes Knochen/HA-Implantat eine Kombination von Nukleation (Keimwachstum) und Epitaxie verantwortlich ist.

Anhand von Hochauflösungs-REM-Untersuchungen am *in vivo* gelegenen eigenen Material kann epitaxiales Kristallwachstum des Knochenminerals am gesinterten Apatit belegt werden (Abb. 51, 68 - 70). Hydroxylapatit hat die Eigenschaft, im festen Aggregatzustand durch Keimwachstum (seeded growth) die Phasenumwandlung



zu katalysieren (2.4.3, 2.5.5, WALTON 1967, DOI u. EANES 1984, DOI et al 1984). Damit könnte der Beweis erbracht sein, daß für den Verbund Knochenmineral/HA-Implantat Nukleation und Epitaxie mit verantwortlich sind. Die Anwendung dieser Mechanismen auf den Verbund Kollagen/HA-Implantat ist nicht ohne weiteres möglich, da eventuelle Ca-PO_4 -Nukleationsstellen des Kollagens nicht bewiesen sind.

Die REM-Untersuchungsergebnisse beweisen, daß ein ins Knochenlager eingesetztes unbelastetes HA-Implantat einen Verbund mit dem Knochen eingehen kann. Die Verbundzone läßt sich hinsichtlich ihrer Entstehung und Natur wie folgt charakterisieren:

1. Ein ins Knochenbett eingebrachtes Implantat ist infolge des Operationstraumas über mehrere Tage einer schlecht vascularisierten Umgebung mit erniedrigtem pH-Wert ausgesetzt.
2. Hieraus resultiert ein Elutions-Fällungsprozeß, der zu Abbau und Umkristallisation des HA führt. Beide Abläufe werden in ihrer Intensität durch die vorliegende Gesamtporosität sowie durch die Anfälligkeit der Korngrenzen und Einzelkörner gegen-

über dem Angriff beeinflußt. Diese Prozesse scheinen mit der Normalisierung des pH's abzuklingen.

3. Damit erfolgt vermutlich die Phasenumwandlung



4. Elution (Ionenbereich) und Umkristallisierung (ultrastruktureller Bereich) führen zu mikroskopisch sichtbaren Abbauerscheinungen. Die ausgelaugten HA-Implantatkörner werden in den Knochenremodellingprozeß einbezogen. Einige verlieren dabei die werkstoffspezifische hexagonale Struktur.
5. Ultrastrukturelle Zeichen des Elutions-Umbaukristallisierungsablaufes sind sphäritische Kristallite der gleichen kolloidalen Größenordnung wie im Ausgangspulver ($\varnothing$ 200 - 600 Å).
6. Die Kristallite des Knochenminerals selbst sind kolloidaler Dimension. Die ubiquitäre Entstehung von Kristalliten gleicher Größenordnung scheint dabei die Unfähigkeit der *in vivo*-Bedingungen wiederzuspiegeln, Kristalle mikroskopischer Größenordnung reifen zu lassen. Dies steht im Gegensatz zum Sinterprozeß.
7. Bei den erreichten elektronenoptischen Auflösungen erfolgen Verbund und Wachstum des Knochenminerals an abgebauten sowie an umkristallisierten Implantatkörneroberflächen. Das gleiche gilt für unveränderte Implantatkörner.
8. Die in der Literatur beschriebene "amorphe Verbundzone" kann als Schicht von kolloidalen Kristalliten aufgefaßt werden, welche auf Kristallisierungsumbau beruht. Die Breite dieser Zone wird unter Umständen unterschiedlich beeinflußt. Eine Möglichkeit besteht in der Ablagerung von Knochenmineral innerhalb einer Schicht adsorbierter Nicht-Kollagen-Proteine. Doch dürften die Unterschiede in der Breite weitgehend auf die Ausdehnung des umkristallisierten Bereiches zurückführbar sein.
9. Dem Verbund Knochenmineral/HA-Implantat liegt eine Ionenverbindung zugrunde, die durch Nukleation und Epitaxie entsteht.

Für das Zustandekommen eines Verbundes zwischen alloplastischem Ersatzmaterial und Lagergewebe dürfen die Lagerzellen durch das Implantat in ihrer Physiologie nicht beeinträchtigt werden. Deshalb bleibt das Verhalten der Knochenlagerzellen gegenüber dem HA-Implantat zu erörtern. Zunächst hatte die Untersuchung des

implantatnahen und -fernen Gewebes gezeigt, daß es neben den im Bälkchenknochen eingeschlossenen Osteozyten (Abb. 88) weitere in das lockere intertrabekuläre Gewebe eingelagerte Zellen gibt. Diese zeichnen sich durch eine Vielfalt an Gestalt und Dimension aus (Abb. 80 - 87). Zellen amphyöler, bikonvexer, pyramidalen sowie kugelförmiger Form sind nachweisbar. Generell besitzen die mehrflächigen Zellen eine glatte, die kugeligen eine rauhe Oberfläche. Beide Zellarten konnten in direktem Kontakt zur Implantatoberfläche nachgewiesen werden (Abb. 89 - 93). Auch wenn diese polymorphen Zellen eindeutig zur normalen Knochenzellpopulation gehören, so läßt sich ihre genaue Identität doch schwer festlegen. Osteoblasten zeigen je nach Spezies, Alter, metabolischer Aktivität und hormonaler Einwirkung unterschiedliche Größe und Gestalt. "Aktive" Osteoblasten stellen sich abgerundet, pyramidal oder würfelförmig dar (HAM u. HARRIS 1971, MATTHEWS 1980). Osteogenetische Stammzellen treten hingegen abgeplattet bis spindelförmig in Erscheinung (HAM u. HARRIS 1971). Weiterhin ließen sich beim Literaturstudium keine REM-Bilder von osteogenetischen Zellen auffinden, die *in vivo* Bedingungen entstammen. Zudem enthält die Zellkonstellation bei postnataler Knochenentstehung erythro- und leukozytäre Zelllinien.

Daß Zellen des Knochenlagers auf der HA-Implantatoberfläche scheinbar ungestört wachsen, dürfte in den Oberflächeneigenschaften des Werkstoffes begründet sein. Das Verhalten der Zellen gegenüber Festkörpern ist bis heute nicht abschließend geklärt. Die ersten Bemühungen zur Deutung des Zelladhäsions- und -ausbreitungsmechanismus bezogen sich auf die Benetzbarkeit des Festkörpers (2.4.3). Diese basiert auf der Annahme des thermodynamischen Prinzips vom "Zustand geringster Energie". Sie wird bestimmt durch die Gleichgewichtslage zwischen der flüssigkeitsspezifischen Oberflächenspannung und den Oberflächenkräften des Festkörpers. Letzte resultieren aus ungesättigten Bindungen der Oberflächenmoleküle bzw. Atome (Abb. 3). Die kritische freie Oberflächenenergie γ_c ist festkörperspezifisch und kann bestimmt werden (ZISMAN 1963, 1964, GLANTZ 1969, 1971). Ferner entscheidet γ_c darüber, welche Flüssigkeit sich auf welchen Festkörpern ausbreiten kann.

Neben Flüssigmetallen ist Wasser mit $72,6 \text{ dyn cm}^{-1}$ die Flüssigkeit höchster Oberflächenspannung (GLANTZ 1969). Wasser kommt ubiquitär vor und ist für *in vitro* - wie *in vivo* - Systeme

gleichermaßen bedeutsam. Benetzbare Feststoffe gelten als "hydrophil", nicht benetzbare als "hydrophob".

Wenn die Benetzbarkeit zur Erklärung des Prozesses Zelle/Substrat-Haftung einbezogen wird, ist anzunehmen, daß Zellhaftung durch direkte Zelle/Substrat-Kräfte zustandekommt (CURTIS 1964, CARTER 1967). Dafür spricht der Umstand, daß in serumfreien Medien Zellhaftung und -ausbreitung auf hydrophilen besser als auf hydrophoben Oberflächen vor sich gehen (GRINELL et al. 1972, 1973). So findet z. B. auf Wachs keine Zellausbreitung statt (MAROUDAS 1975).

NENTWIG u. GLANVILLE (1984) konnten so im serumfreien Medium aufzeigen, daß bezüglich Zelladhäsion und -ausbreitung HA-Keramik der Al_2O_3 -Keramik überlegen ist. Sie geben weiter an, daß die Zellhaftung an aufgerauhter Al_2O_3 -Keramik fester war als bei Al_2O_3 -Keramik mit Brennhaut. Das unterschiedliche Zelladhäsionsverhalten bei glatter und angerauhter Keramikoberfläche läßt sich durch den differenten Benetzbarkeitsgrad erklären. Das Aufrauen dürfte Unterbrechungen intermolekularer Bindungen herbeiführen. Daraus resultiert eine ungenügende Sättigung der neuentstandenen Oberfläche.

In serumhaltigen Medien werden die Serumproteine auf dem Substrat adsorbiert, bevor Zellanhaftung stattfinden kann (ROSENBERG 1960, TAYLOR 1961, WEISS 1961). Im 100 % serumhaltigen Medium scheint sogar das unterschiedliche Adhäsionsverhalten hydrophiler und hydrophober Festkörperoberflächen aufgehoben zu werden (WEISS u. BLUMENSON 1967). Eine Theorie, welche lediglich mechanische Zelle/Substrat-Wechselwirkungen berücksichtigt, scheint für *in vivo*-Bedingungen nicht anwendbar. Das eingesetzte Implantat kommt vor möglichen Wechselwirkungen mit Lagerzellen zunächst mit Proteinen in Berührung, die in Blut und extrazellulären Flüssigkeiten enthalten sind.

Viele Zellen verweigern bei mangelnder Zelladhäsion am Substrat Proliferation, Wachstum und Differenzierung (STOKER et al. 1968, MAROUDAS 1973, FOLKMANN u. MASCONA 1978). Diese unerläßliche Verankerung trägt die Bezeichnung "anchorage dependence". Hiermit in Übereinstimmung sollen Tierzellen bei Teilung, Wachstum und Differenzierung Adhäsionssubstanzen ausscheiden (YAMADA 1978,

YAMADA u. OLDEN 1978). Diese als Adhäsionsglykoproteine identifizierten Substanzen kommen zell- und matrixgebunden sowie zirkulierend im Plasma vor. Die am meisten erforschte Variante hat in der Literatur unterschiedliche Bezeichnungen: "Zelloberflächenprotein" - cell surface protein, CSP (YAMADA u. WESTON 1974) -; "Kälteunlösliches Glykoprotein" - cold insoluble glycoprotein, CIG (MORRISON et al. 1948, MOSESSON u. UMFLEET 1970) -; large external transformation sensitive (LETS-)protein (HYNES u. BYE 1974) und Fibronectin (YAMADA u. OLDEN 1978).

Die günstigere Haftkinetik hydrophiler gegenüber hydrophoben Substratoberflächen führt GRINELL (1978) auf eine qualitätsunterschiedliche Bindung dieser Substanz zurück. Demnach wird das Fibronectin an hydrophilen Oberflächen in einer biologisch aktiveren Konfiguration gebunden als an hydrophoben (GRINELL u. FELD 1981). Neben dem Zelloberflächen-Fibronectin tritt auch Plasma-Fibronectin (PFn) in einer Spurenkonzentration von 300 µg (MOSESSON u. UMFLEET 1970) auf.

Bezüglich der chemischen Struktur ist Fn ein Dimer mit dem Mol. Gew. von ca. 2 x 200 kD. Die beiden Fragmente sind durch eine Disulfid-Brücke verbunden (Abb. 101). PFn wird erst nach Bindung am Substrat und Umwandlung in eine nicht lösliche Form adhäsionsfähig (RUOSLAHTI 1984). Es besitzt Bindungsstellen für Zellen und unterschiedliche Substrate (HYNES u. YAMADA 1982, RUOSLAHTI 1984) und vermittelt sowohl zwischenzelluläre Anhaftung wie Zellanhaftung und -ausbreitung am Substrat (GRINELL 1978). Adsorbiertes PFn dient der Bindung von Zellrezeptoren. Dadurch kommt es zur Zelladhäsion (CULP et al. 1979, LATERRA et al. 1980).

Bei den eigenen Proben konnten Zelladhäsion und -ausbreitung am Implantat nachgewiesen werden (3.4.3 b). Dabei fand sich immer wieder flächenförmig und faserartig zusammengelagertes Material mit höckriger Oberfläche. Dieses deckte zum Teil die Keramikoberfläche ab und war auch den Zellen angelagert (Abb. 90 - 93). In einigen Bereichen nimmt es dendritische Verteilung an. Die Zellen scheinen darin verankert zu sein. Es erhebt sich die Frage, ob dieses Material das beobachtete Zellverhalten beeinflussen kann.

Bei Knocheninduktion durch Knochenmatrix (2.5.4) konnten WEISS u. REDDI (1980 a) im Rattenversuch eine Affinität zwischen Matrix

und zirkulierendem Fn nachweisen. Weiterhin konnten sie dabei zeigen, daß Osteo- und Chondrogenese mit hohen lokalen Fibronektinwerten einhergehen. Für die Osteomorphogenese scheint Adhäsion von osteogenetischen Zellen sowohl *in vivo* (WEISS u. REDDI 1980 b, 1981, STUTZMANN u. PETROVIC 1982) als auch *in vitro* (WEISS et al. 1981, TIBONE u. BERNARD 1982) unerlässlich zu sein.

So haben *in vitro* - Versuche gezeigt, daß Fibronektin die Zelladhäsion und -ausbreitung positiv beeinflusst. Die Beschichtung von Substraten mit Fn verbessert Zellausbreitung und -wachstum entscheidend (GRINELL u. MARSHALL 1982). SEITZ et al. (1982) konnten vermehrte Zellausbreitung bei fibronektinbeschichteten Biogläsern im Vergleich zu nicht beschichteten nachweisen.

Das bei den eigenen Proben aufgefundene Material lag zwischen Zellrand und Werkstoff sowie interzellulär. Anhand der Immunofluoreszenz-Mikroskopie (DESSAU et al. 1978, PENNYPACKER et al. 1979, RAJARAMAN et al. 1983, RAHFOTH 1984) und im REM (YAMADA 1978, WEISS u. REDDI 1980 b, MEIER u. DRAKE 1984) konnte polymeres Fibronektin an Substraten und Zelloberflächen nachgewiesen werden. Diese Lokalisation entspricht den eigenen Proben (Abb. 91 - 93). Die Analytik zur eindeutigen Identifikation der Substanz konnte in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt werden.

Aufgrund der chemischen Zusammensetzung des HA steht für die Haftkinetik eine große Menge von Ca^{++} -Ionen zur Verfügung (2.4.1). Diesbezüglich sind in der Literatur über Zelle/Substrat-Haftung Modelle aufgeführt, welche die Haftkinetik auch durch zweiwertige Kationen zu erklären suchen. Demnach wird die Haftung durch Mn^{++} -Ionen (RABINOVITCH u. DE STEFANO 1973, MAROUDAS 1975), Mg^{++} - und vor allem Ca^{++} -Ionen (CURTIS 1973, CULP 1974, GRINELL 1976) gefördert. GRINELL (1976) konnte zeigen, daß bei Abwesenheit von Ca^{++} -Ionen im Medium Anhaftung zwar stattfindet; Zellausbreitung auf dem Substratum jedoch völlig ausbleibt.

Fn besitzt spezifische Bindungsstellen für Ca^{++} -Ionen (AMPHLETT u. HRINDA 1983). Unter Gerinnselbildungsbedingungen durch Zusatz von Ca^{++} -Ionen erhöht sich die Konzentration des adsorbierten Fibronektins. Dies geschieht unter unbeeinträchtigter oder sogar

erhöhter Adhäsionseffektivität (GRINELL u. PHAN 1983). Diese Autoren vermuten ferner, daß ein Substrat, welches Gerinnselbildung fördert, eine erhöhte Adsorption von Fibronektin bewirken dürfte. Von der Koagulationsdynamik ist die gerinnselfördernde Wirkung der Ca^{++} -Ionen bekannt. Bei Elution eines HA-Implantates werden Ca^{++} -Ionen in das Implantatlager abgegeben und an der Werkstoffoberfläche freigesetzt (3.5.6).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß ein gesinterter HA-Werkstoff Knochenlagerzellen direkten Zugang zu seiner Oberfläche erlaubt, da keine bindegewebige Einscheidung stattfindet. In Betracht seiner dargelegten Oberflächeneigenschaften (2.4.3) kann davon ausgegangen werden, daß dieser Zugang sogar gefördert wird. Hierdurch ist den Zellen die Möglichkeit gegeben, kalzifizierbare Matrix unmittelbar am Werkstoff abzulagern. Die physikalisch-chemischen und zellulären Vorgänge, die zur physiologischen Verkalkung führen, können somit am Werkstoff selbst stattfinden.

Da HA-Apatitkörner als Realkristalle Baufehler aufweisen dürften, werden sie im Lager der Elution ausgesetzt sein. Durch die Dislokation von Ionen entstehen vermehrt Kristallbau-Defekte und damit weitere Nukleationsstellen. Gleichzeitig kann sich Knochenapatit aufgrund der räumlichen Übereinstimmung mit dem Apatitgitter direkt auf dem HA-Implantat ablagern.

Die Freisetzung von Ca^{++} -Ionen scheint über die Fibronektinbindung (Abb. 101) Adhäsion und Ausbreitung von Zellen zu begünstigen. Die Gesamtheit dieser Faktoren kann bei einem unbelasteten HA-Implantat zu einem physikalisch-chemischen Verbund mit dem Knochen führen. Physikalisch-chemisch und phänomenologisch verhält sich damit das Implantat genau so wie das Wirtsgewebe selbst. Den physikalisch-chemischen Abläufen sollte dabei anhand von Korrosionsversuchen weiter nachgegangen werden.

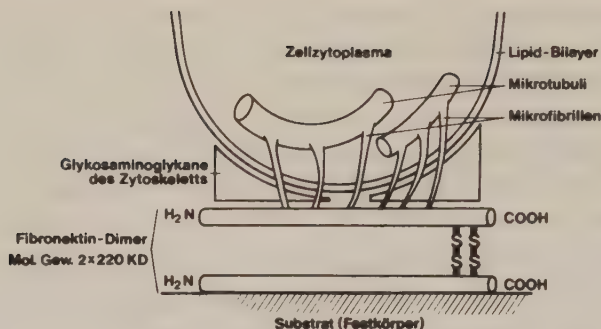


Abb. 101

Darstellung des hypothetischen Mechanismus bei Zelladhäsion und -ausbreitung. Das Adhäsionsprotein Fibronektin soll diese Prozesse vermitteln

4.4 Korrosionsversuche

Über die Lösungsvorgänge an der Oberfläche eines ins wässrige Medium eingebrachten HA-Keramikwerkstoffes haben wir bereits berichtet (BAGAMBISA 1984, FISCHER-BRANDIES et al. 1985). Besondere Bedeutung kommt dabei dem begleitenden β -TCP zu. Es konnte festgestellt werden, daß sich das β -TCP aus der Werkstoffoberfläche herauslöst, um sich dann wieder als thermodynamisch stabiler HA niederzuschlagen. Bei Besprechung der *in vivo*-REM-Befunde (3.4.3 b) wurde auf die mit den Implantatkörnern verwachsenen sphäritischen Gebilde hingewiesen, die nicht lagergebeständig zu sein scheinen. Hierbei könnte es sich um Lösungs-Fällungs-Kristallite handeln, die infolge eines physikalisch-chemischen Angriffs entstehen.

REM-Untersuchungen an Proben aus dem Korrosionsversuch (Abb. 96 u. 97) zeigten Oberflächen, die kaum von denen zu unterscheiden waren, welche dem *in vivo*-Milieu ausgesetzt gewesen waren (3.5.4). Auf die Ähnlichkeit der Umwandlungskristallite mit dem Knochenmineral wurde bereits (3.4.3) hingewiesen. Die Oberflächenstruktur der *in vitro*-Korrosionsproben

(Abb. 96 u. 97) sieht den Implantaten mit *in vivo* niedergeschlagenem Knochenmineral (Abb. 60, 57 - 59) ähnlicher als die Ausgangsoberfläche der Kontrollproben (Abb. 95).

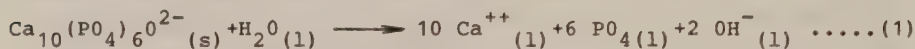
Aus der Spurenanalytik des Mediums der Korrosionsversuche (3.5.6) geht hervor, daß das Verhalten verschiedener Proben quantitativ sehr unterschiedlich ist. So gehen bei Probe A über die gesamte Versuchsdauer (4 Wochen) Calcium- und Phosphationen bei ständig ansteigenden Gradienten in Lösung (Abb. 98). Bei Probe B hingegen werden die höchsten Meßwerte im Medium nach 1 Woche bestimmt. Die 2- und 3-Wochen-Werte fallen hingegen kontinuierlich ab. Erst in der 4. Woche ist ein geringer Anstieg der Calcium- und Phosphationenkonzentration feststellbar, die jedoch die nach 1 Woche bestimmten Werte nicht erreicht (Abb. 99). Als mögliche Ursache der unterschiedlichen Löslichkeit bei gleicher Versuchsanordnung können nur strukturelle und chemische Unterschiede der Werkstoffzusammensetzung in Erwägung gezogen werden.

Dies findet seine Bestätigung in den REM-Untersuchungen, wo Unterschiede im Gefügeaufbau festgestellt werden (Abb. 9 - 11). Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie konnte an einem willkürlich ausgewählten dichtgesinterten HA-Implantat Begleit- β -TCP in der Konzentration von ca. 20 % nachgewiesen werden. JARCHO (1981) weist darauf hin, daß dichtgesintertes reines β -TCP in Abhängigkeit vom pH-Wert 12 - 22 mal löslicher ist als dichtgesinterter reiner HA. Das uneinheitliche Löslichkeitsverhalten der beiden Proben wird ein Hinweis auf unterschiedliche chemische Zusammensetzung, vor allem in bezug auf β -TCP sein.

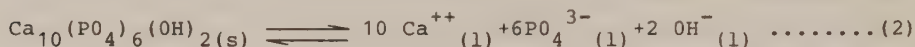
Beiden Proben ist jedoch gemeinsam, daß das Ca/P-Verhältnis im Korrosionsmedium während der Versuchszeit (1 - 4 Wochen) bis zu einem Minimum von 1,2 absteigt, um sich dann nur noch unmerklich zu verändern (Tab. 6). Die Verschiebung des Ca/P-Verhältnisses scheint in der Natur der Calciumphosphate zu liegen. Zur Interpretation der Löslichkeitsversuche wird die Dynamik von HA in wässriger Lösung herangezogen.

Anhand der eigenen röntgendiffraktometrischen Untersuchungen konnte festgestellt werden (3.1.3.2), daß die Proben zu ca. 20 % aus β -TCP bestehen. β -TCP wird in wässriger Lösung zu (vermutlich

Defekt-) HA hydrolysiert werden (GMELIN 1961). Ferner entsprechen die bei hohen Temperaturen hergestellten "Hydroxylapatite" mehr "Hydroxyloxyapatiten" infolge beigemengten Oxyapatits $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}^{2-}$ (DRIESSENS 1982, 1983). In wässriger Lösung ist OA instabil und reagiert mit Wasser nach:

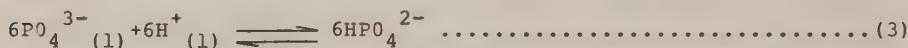


Andererseits geht in wässrige Lösung eingebrachter HA zunächst kongruent (d. h. stöchiometriegerecht) in Lösung:

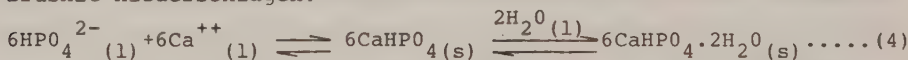


Danach müßten sich auch die Produkte von β -TCP, OA und HA gleichermaßen verhalten. Infolge dessen sollte das Korrosionsmedium zumindest anfangs der Stöchiometrie der Probenzusammensetzung entsprechende Calcium- und Phosphationenkonzentrationen enthalten.

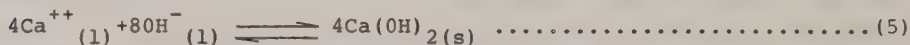
Dennoch können die Ca^{++} -, PO_4^{3-} - und OH^{-} -Ionen miteinander wie mit den H_3O^{+} -Ionen des Mediums reagieren. PO_4^{3-} -Ionen sind instabil und nehmen unter neutralen und sauren Bedingungen Wasserstoff-Ionen auf:



Die HPO_4^{2-} -Ionen können sich dann mit einem Teil der Ca^{++} -Ionen als weniger lösliches Monetit (CHICKERUR u. MAHAPATRA 1978) und Brushit niederschlagen:



Weiterhin können sich die OH^{-} -Ionen mit den verbleibenden Ca^{++} -Ionen als weniger lösliches $\text{Ca}(\text{OH})_2$ niederschlagen (CHICKERUR u. MAHAPATRA 1978):



Schlagen sich Komplexe der aus den Gleichungen 4 und 5 entstandenen Produkte an der Probenoberfläche nieder, so wird sich auch die Zusammensetzung der Probenoberfläche verändern. Da die dargelegten Reaktionsabläufe zu einem Einbau von HPO_4^{2-} -Ionen in die Probenoberfläche führen, resultiert daraus eine fortschreitende Herabsetzung des Ca/P-Verhältnisses. Dies steht in uneingeschränktem Einklang mit Tab. 6.

Daraus folgt, daß der neue Gleichgewichtszustand zwischen Korro-

ssionsmedium und Probenoberfläche nicht mehr der Stöchiometrie des Anlieferungszustandes entsprechen kann, sondern sich in saurere - calciumärmere - Richtung verschiebt.

5 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen

Im Zuge des Hartgewebeersatzes ist der operativ Tätige bis heute immer noch gezwungen, zwischen Systemen und Materialien zu wählen, die bezüglich Festigkeit, Beständigkeit, Retention, Funktionstüchtigkeit und Gewebeverträglichkeit lediglich einen Kompromiß darstellen. Anlaß zu den vorliegenden Untersuchungen waren Berichte in der Literatur über die hervorragende Gewebeverträglichkeit von Biogläsern, Glaskeramiken und gesinterten HA-Implantatwerkstoffen. Hier interessierte insbesondere die Verbundsosteogenese. Die eigenen Untersuchungen zielten darauf ab, die Mitteilungen in bezug auf HA-Werkstoffe zu überprüfen. Sollte sich der Verbund bestätigen lassen, so bestand die weitere Aufgabenstellung darin, seine Grundlagen und Entwicklungsprozesse näher zu bestimmen. Fernerhin sollte festgestellt werden, ob sich die Erfolgsrate von Allenthesen zum Knochenersatz durch Verbesserung der Werkstoffeigenschaften steigern läßt.

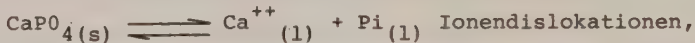
Zunächst galt es, über die Ausgangsstoffe und deren Sinterprodukte nähere Aufschlüsse zu erhalten (4.1). Der Werkstoff wurde auch bezüglich seines Verhaltens in wässriger Lösung überprüft (4.4). Es kann festgestellt werden, daß der biologische Apatit des Zahnschmelzes, des Dentins und des Knochenminerals ultrastrukturelle Gemeinsamkeiten aufweist (3.4.3 a). Die Unterschiede im Kristallaufbau von synthetischem Implantat und natürlichem Knochenmineral wurden dann zur Bewertung der ultramorphologischen Beziehungen zwischen beiden herangezogen (3.4.3 b). Durch lichtmikroskopische Untersuchungen waren Vorinformationen über die Gewebereaktion auf die Keramik gewonnen worden (3.3.3, 4.2). Die Ergebnisse bekräftigen und bestätigen, daß es bei nicht belasteten HA-Implantaten zur Entwicklung eines Verbundes mit dem Knochenlager kommen kann. Die vorliegenden Informationen berechtigen ferner zu einer Stellungnahme bezüglich Natur und Entwicklung des Verbundes.

Bei allen untersuchten Proben können die mikroskopischen und feinbaulichen Zeichen einer engen Beziehung zwischen Implantat und

gesetzmäßig strukturiertem Knochengewebe festgestellt werden. Hochauflösungs-REM-Ergebnisse belegen das Wachstum von Knochenminerkristalliten direkt auf HA-Implantatkörnern. Dieser Vorgang ist der Epitaxie zuzuordnen.

Das Verwachsen Knochenapatit/Sinterapatit kann auf Nukleationsvorgänge zurückgeführt werden. Hydroxylapatit stellt kristallstrukturell ein Gitterwerk aus Ca^{++} -, PO_4^{3-} - und OH^- -Ionen dar. Die Gefügekörner bieten dabei Keime an (Nukleationsloci), welche dem Ionengitterwerk in Form von Knochenminerkristalliten einen Anbau ermöglichen. Als fördernde Faktoren gelten die Übereinstimmung der Ionengitter, aber auch Baufehler im Implantatkorn. Einen Einfluß auf diese Vorgänge hat dabei das wässrige Körpermilieu des Lagergewebes. So kann das durch den Sinterungsprozeß erreichte kristallchemische Gleichgewicht insbesondere auf freiliegenden Kornoberflächen verändert werden.

Kontakt mit wässrigen Lösungen verursacht aufgrund



was die Nukleationsstellen erhöhen dürfte. Ferner erfolgt Umfällung in Form kolloidaler Kristallite ($200 - 500 \text{ \AA}$), wodurch die spezifische Oberfläche erheblich vergrößert wird. Dies ist für das epitaxiale Wachstum des Knochenminerals insofern von besonderer Bedeutung, weil Fällung nur an Festkörperoberflächen erfolgen kann. Ultrastrukturell nachweisbare Umfällungskristallite sind jedoch keine *conditio sine qua non* für die Nukleationsablagerung.

Zur Genese des Verbundes Kollagen/Implantat kann hier allerdings keine abschließende Stellung bezogen werden. Nukleation und Epitaxie lassen sich jedoch als Entstehungsmechanismen des beobachteten Verbundes Knochenkollagen/Implantat zumindest in Erwägung ziehen.

Bezüglich der Entwicklung des Verbundes Knochen/HA-Implantat lassen sich folgende Schlüsse ziehen (Abb. 102):

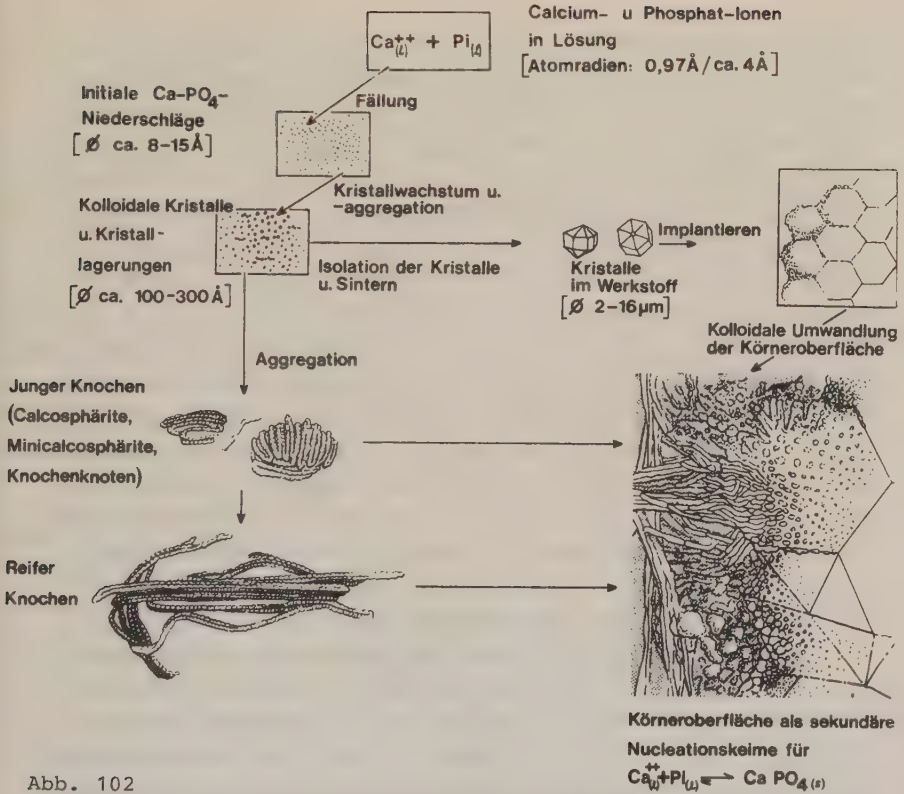


Abb. 102

Graphische Darstellung der Entwicklung des Verbundes Knochen/HA-Implantat und der Beziehungen zwischen Calciumphosphat-Niederschlägen, Sinterkörpern und Knochenmineral

1. Die *in vitro*-Fällung von Calciumphosphaten zur Herstellung von Sinterprodukten, die Umkristallisation von in wässriger Lösung befindlichen Sinterprodukten und die *in vivo*-Fällung von Knochenmineral können physikalisch-chemisch als gleicher Vorgang aufgefaßt werden. Es handelt sich in allen Fällen um spontane oder/und katalysierte Phasenveränderungen von gelösten Ionen zum festen Aggregatzustand nach:



2. Die dadurch entstandenen Kristallite sind zwar Kristallwachstum und -aggregation unterworfen, doch wachsen sie nur bis zu einer Größe von einigen hundert Å. Sie messen bei *in*

v i t r o - Fällung 100 - 300 Å, bei Umkristallisierung von Sinterprodukten sowie im Knochenmineral 200 - 1000 Å.

3. Werden solche Calciumphosphate einem beeinflussbaren Kristallzüchtungsprozeß - z. B. dem Sintern - ausgesetzt, so kann die Teilchengröße deutlich größer sein. Dies wird bei der Herstellung von HA-Implantatwerkstoffen genutzt, wobei gefügespezifische hexagonale Mikrokristalle durch Kristallneubildung und Kristallwachstum entstehen. Die Gefüge-Mikrokristalle messen beim verwandten Werkstoff 2 - 16, durchschnittlich 5 - 8 µm.
4. Bei Implantationen unterliegen die Werkstoffkristall-Oberflächen aufgrund $\text{CaPO}_4(s) \rightleftharpoons \text{Ca}^{++}(l) + \text{Pi}(l)$ einem dynamischen Lösungs-Umfällungs-Gleichgewicht. Das Kristallwachstum bei Umfällung ist im Gegensatz zu Kristallzüchtungsprozessen wenig steuerbar. Das Calciumphosphat lagert sich in Form von kolloidalen Kristalliten ab (Abb. 102). Die Umfällung bewirkt somit eine Umwandlung der Implantatkörneroberfläche in kolloidale Strukturen. Weist das Lager infolge des Implantationstraumas niedrige pH-Werte auf, so wird sich die Gleichgewichtslage zugunsten von Elution und Abbau des Implantates verschieben. Dies dürfte in den ersten postoperativen Tagen der Fall sein.
5. Die Prozesse im Lager nach Implantation üben einen entscheidenden Einfluß auf das Allenthesengefüge aus. Das Nachlassen der entzündlichen Reaktionen erfolgt gleichzeitig mit der Resorption nekrotischer Knochenelemente, dem Hämatomabbau und dem ansteigenden Calciumspiegel im Osteotomiebereich. Dies stimmt auch zeitlich mit der Knochenneubildung durch überlebende Osteoblasten sowie neuentstandene Präosteoblasten überein. Dadurch entsteht vorläufiger Callus.
6. Durch die Biokompatibilität des HA-Werkstoffes scheint die direkte Anhaftung und Ausbreitung knochenbildender Zellen gewährleistet zu sein. Nur auf diesem Wege ist die Absonderung von Osteoid und dessen Verkalkung unmittelbar am Implantat möglich. Das Zellverhalten wird hierbei vermutlich durch das Protein Fibronektin beeinflusst. Durch begrenztes Wachstum und Aggregation der primären Sphärokristallite entwickeln sich die am Implantat gebundenen Knochenmineralkristallite (Ø 200 - 500 Å) zu nadelförmigen, plättchenförmigen sowie unregelmäßig gestalteten Gebilden. Der Zusammenschluß dieser Kristallite

führt weiterhin zu den für jungen Knochen typischen Calcosphäriten sowie zu mineralisierten Kollagenfasern und -bündeln beim reifen Knochen (Abb. 102).

7. Ist es vor der Knochenablagerung zu einer kolloidalen Umwandlung der Implantatkörneroberfläche gekommen, so verbindet die Umwandlungsschicht den Knochen mit dem Implantat. Wahrscheinlich findet auf diese Weise die in der Literatur beschriebene "amorphe Verbundzone" ihre Erklärung.
8. Der Verbund Knochen/HA-Implantat ist eine dynamische Struktur und wird durch die physiologischen Grundlagen des Knochenumbaus (Remodelling) beeinflusst. Das Verhalten des verwandten Implantatwerkstoffes im Lager erlaubt die Schlußfolgerung, daß er befriedigende strukturelle, chemische und elektrische Oberflächeneigenschaften besitzt, die zu einem Verbund mit dem Knochen führen. Hierdurch wird auch die beobachtete Lagergewebereaktion verständlich:
 - Ein ins knöcherne Lager eingebrachtes HA-Implantat heilt reizlos ein, wird osteointegriert und steht in unmittelbarer Beziehung zu regelgerecht strukturiertem Knochengewebe. Dies ohne eine histologisch nachweisbare bindegewebige Zwischenschicht.
 - Knochengewebe wächst an enossal und subperiostal eingesetzten nicht belasteten HA-Implantaten empor; zusätzlich durchwächst Knochen die interkonnektierenden Poren makroporöser Sinterprodukte.
 - Das Knochengewebe um das Implantat sowie innerhalb der Makroporen treibt seine Umbaudynamik ungestört weiter.
9. Die Einbeziehung des HA-Implantates in das Knochenremodelling hat weitreichende Folgen für die langfristige Funktionstüchtigkeit von Allenthesen. Das Vorhandensein von Makroporen ermöglicht z. B. die Besiedlung des Implantates durch Knochengewebe. Durch Makro- und Mikroporen wird jedoch die spezifische Oberfläche des Implantates erheblich vergrößert. Dies beschleunigt insbesondere Implantateluion und -abbau während der ersten Wochen. Doch bleibt diese Resorptionsbeanspruchung - wenn auch vermutlich gemindert - in Anbetracht des normalen Knochenumbaus weiter bestehen. Enthalten die HA-Implantate unerwünschtes β -TCP, so wird der Implantatabbau schneller fort-

schreiten.

10. In Bereichen, wo der Bestand zugebildeten Knochens gesichert ist, sind Implantatabbau und dessen Ersatz durch neuen Knochen sogar als wünschenswert anzusehen. Grundsätzlich anders liegen die Verhältnisse aber dann, wenn atrophierter Knochen auf Dauer durch HA ersetzt werden muß, da eine Regeneration nicht erwartet werden kann. So bedingen zum Beispiel genetische und andere Faktoren - wie Zahnverlust und unphysiologische Belastung durch Prothesen - den kontinuierlichen Knochenschwund der Kiefer. Hier kann eine knöcherne Umwachsung des im Zuge der Kieferkammaugmentation aufgebrauchten HA-Granulates nicht erwartet werden. Um bei solchen Anwendungen langfristige Funktionstüchtigkeit der Allenthesen zu gewährleisten, sollte bei der Herstellung der Werkstoffe auf den absoluten Ausschluß von Mikroporen und von Begleitphasen geachtet werden.

6 Zusammenfassung

Hydroxylapatitkeramik (Pentacalciumhydroxidtriphosphat) wird den sogenannten bioaktiven Implantatwerkstoffen zugerechnet. Zunächst galt es, durch werkstoffkundliche Untersuchungen die grundsätzliche Eignung des Materials für den Knochenersatz zu überprüfen. Diesbezügliche Informationen lieferten Hochauflösungs-Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen am Ausgangswerkstoff (Hydroxylapatitpulver, Merck). Auch die zur Verfügung stehenden Implantate selbst wurden Rasterelektronenmikroskopisch und Röntgendiffraktometrisch untersucht. Die Ergebnisse der Analytik und in vitro-Korrosionsversuche mit spurenanalytischer Elementbestimmung im Medium rechtfertigten die Implantation im Tierversuch.

Zum Studium des zeitlichen Ablaufes der sichtbaren biologischen Reaktion des Lagergewebes wurden poröse und dichtgesinterte HA-Keramikblöcke in die Femurdiaphysen von zwei Hunden eingebracht. Insgesamt 12 Implantate lagen 6 Wochen bzw. 6 Monate.

Histologische Untersuchungen lassen eine normale Umbaudynamik des implantatnahen und -fernen Knochengewebes erkennen. In der Grenzzone stehen Knochen und synthetischer Werkstoff in unmittelbarer Beziehung zueinander. Beim Fehlen jeglicher histologisch nachweis-

baren Zwischenschicht entsteht bei unbelasteten Implantaten bereits nach 6 Wochen der Eindruck einer "Osteointegration".

Rasterelektronenmikroskopisch können Adhäsion und Ausbreitung von Lagerzellen auf der Allentese nachgewiesen werden. Durch Hochauflösungs-REM-Untersuchungen ist ein Verwachsen des Knochenminerals und -kollagens mit dem Implantatgefüge belegbar. Die freien Oberflächen der Gefügekörner unterliegen im Lager zum Teil einer Umkristallisation. Die Kristallite im Umkristallisationsbereich entsprechen in ihrer Größe und Gestalt den Knochenmineral-Grundpartikeln.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß der verwandte HA-Implantatwerkstoff befriedigende strukturelle, chemische und elektrische Eigenschaften besitzt, die zu einem physikalisch-chemischen Verbund mit dem Knochen führen können. Der Verbund dürfte auf einem Impf-Nukleation-Komplex basieren. Ultramorphologisch steht regelrecht strukturierter Knochen in direkter Beziehung zu ursprünglichen bzw. umkristallisierten Oberflächen des Gefügekorns.

Die Verbundzone Knochen/HA-Implantat hat aufgrund des ständigen Knochenumbaus dynamische Natur. Bei der Herstellung von HA-Implantatwerkstoffen zum Knochenersatz sollte darauf geachtet werden, daß Mikroporen und Begleitphasen nicht auftreten.

Literaturverzeichnis

- Allard RHB, Swart JGN: Orbital roof reconstruction with hydroxyapatite implant. J Oral Maxillofac Surg (40) 237-239, 1982.
- Amler MH, Gold W: Osteopoetin - humoral induction factor in osteogenesis. J Periodontol (51) 185-189, 1980.
- Amphlett GW, Hrinda ME: The binding of calcium to human fibronection. Biochem Biophys Res Commun (111) 1045-1053, 1983.
- Andrews EH: Fracture. In: The mechanical properties of biological materials - 34th Symp. of the society for experimental biology. Vincent JFV, Currey JD (Hrsg) SS. 13-35. Cambridge University Press, Cambridge 1980.
- Aoba T, Moreno EC: Preparation of hydroxyapatite crystals and their behavior as seeds for crystal growth. J Dent Res (63) 874-880, 1984.
- Arnold PW: The nature of precipitated calcium phosphates. Trans Faraday Soc (46) 1061-1072, 1950.
- Ash P, Loutit JF, Townsend KMS: Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. Nature (283) 669-670, 1980.
- Bagambisa F: Grenzschichtstrukturen Hydroxylapatit-Knochen beim Hund. Vortrag auf der 1. Jahrestagung des Arbeitskreises "Implantologie" innerhalb der Dtsch. Gesellsch. ZMK. München 27./28. April 1984.
- Bagambisa F: Experimentelle Untersuchungen zur biologischen Reaktion auf Hydroxylapatit-Keramik. Vortrag auf dem 6. Arbeitskreis Implantate DVM und AO-International, Berlin 12. 11. 85.
- Bang B: Induction of heterotopic bone formation by demineralised dentin in guinea pigs: Antigenicity of the dentin matrix. J Oral Pathol (1) 172-185, 1972.
- Bang G: Induction of heterotopic bone formation by demineralised dentin in rats and guinea pigs. Scand J Dent Res (81) 240-250, 1973.
- Bargmann W: Knochengewebe. In: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. SS. 142-168, Thieme, Stuttgart 1962.
- Barth A: Über histologische Befunde nach Knochenimplantationen. Langenbecks Arch Klin Chir (46) 409-417, 1893.
- Barth A: Über Osteoplastik in chirurgischer Beziehung. Langenbecks Arch Klin Chir (48) 466-477, 1894.

- Barth A: Histologische Untersuchungen über Knochenimplantationen. Beitr Path Anat (17) 65-142, 1895.
- Bassett CAL: Biophysical principles affecting bone structure. In: The biochemistry and physiology of bone, Bourne GH (Hrsg) Vol III SS. 1-76, Academic Press, N. Y., 1971
- Bassett CAL: Clinical implication of cell function in bone grafting. Clin Orthop (87) 49 - 59, 1972.
- Bassett CAL, Pawluk RJ, Becker RO: Effects of electric currents on bone in vivo. Nature, London (204) 652-654, 1964.
- Bassett CAL, Pawluk RJ: Nonirritative methods for stimulating osteogenesis. J Biomed Mater Res (9) 371-374, 1975.
- Bechtol CO, Ferguson AB, Laing PG: Metals and engineering in bone and joint surgery. Williams, Wilkins, Baltimore, Maryland 1959. Nach Hench und Ethridge zitiert. In: Biophysics and Bioengineering series, Noordgergraaf A (Hrsg) Vol IV - Biomaterials: an interfacial approach. SS. 97-98, Academic Press, N. Y. 1982.
- Becker RO, Spadaro JA, Marino AA: Clinical experiences with low intensity direct current stimulation of bone growth. Clin Orthop (124) 75-83, 1977.
- Beckham CA, Greenlee TK JR, Crebo AR: Bone formation at a ceramic implant interface. Calcif Tissue Res (8) 165-171, 1971.
- Bell LC, Mika H: The pH dependence of the surface concentrations of calcium and phosphorus on hydroxyapatite in aqueous solutions. J Soil Sci (30) 247-258, 1979.
- Bernard GW, Pease DC: An electron microscopic study of initial intramembranous osteogenesis. Am J Anat (125) 271-290, 1969.
- Bingham PJ, Brazell IA, Owen M: The effect of parathyroid extract on cellular activity and plasma calcium levels in vivo. J Endocrinol (45) 387-400, 1969.
- Blencke BA, Brömer H, Deutscher KK: Compatibility and long-term stability of glass ceramic implants. J Biomed Mater Res (12) 307-316, 1978.
- Blencke BA, Pfeil E, Brömer H: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Reaktion des Knochens auf glaskeramische Implantate. Z Orthop (112) 978-980, 1974.
- Blencke BA, Strunz V, Bunte M, Brömer H, Deutscher K: Experimentelle und erste klinische Erfahrungen mit dem bioaktiven Werkstoff: Glaskeramik. Orthop Praxis (13) 799-804, 1977.

- Bocciarelli SD: Morphology of crystallites in bone. *Calcif Tissue Res* (5) 261-269, 1970.
- Boskey AL: Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin Orthop* (157) 225-257, 1981.
- Boutin P: Direct attachment of ceramic joints. 5th Annual Biomed Mater Res Symp 1974 (nach Hench u. Ethridge 1982 zitiert).
- Boyde A: Scanning electron microscope studies of bone. In: *The Biochemistry and Physiology of Bone*. Bourne GH (Hrsg) Vol 1 SS. 259-310, Academic Press N. Y. 1972.
- Boyde A, Hobdell MH: Scanning electron microscopy of lamellar bone. *Z Zellforsch* (93) 213-231, 1969 a.
- Boyde A, Hobdell MH: Scanning electron microscopy of primary membrane bone. *Z Zellforsch* (99) 98 - 108, 1969 b.
- Boyde, Lester KS: The fine structure of peritubular dentine. *J Anat* (102) 144 - 145, 1967.
- Boyde A, Wood C: Preparation of animal tissues for surface-scanning electron microscopy. *J Microsc* (90) 221-249, 1969.
- Bredig MA, Frank HH, Füdner H: Beiträge zur Kenntnis der Kalk-Phosphorsäure-Verbindungen II. *Zeitschr Electrochem* (39) 959-969, 1933.
- Brighton CT, Friedenbergh ZB, Mitchell EI, Booth RE: Treatment of non-union with constant direct current. *Clin Orthop* (124) 106-123, 1977.
- Brighton CT, Friedenbergh ZB, Zemsky LM, Pollis RP: Direct-current stimulation of non-union and congenital pseudoarthrosis; exploration of its clinical application. *J Bone Joint Surg* (57A) 368-377, 1975
- Brown WE: Crystal growth of bone mineral. *Clin Orthop* (44) 205-220, 1966.
- Brown WE, Session V: General Comment. *J Dent Res* (58B) 857-860, 1979.
- Brown WE, Schroeder LW, Ferris JS: Interlayering of crystalline octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *J Phys Chem* (83) 1385-1388, 1979.
- Budenz R, Bernard G: Osteogenesis and leucopoiesis within diffusion-chamber implants of isolated bone marrow subpopulations. *Am J Anat* (159) 455-474, 1980.
- Bunte M, Strunz V: Ceramic augmentation of the lower jaw. *J Maxillo-fac Surg* (5) 303-309, 1977.

- Carter SB: Haptotaxis and the mechanism of cell motility. Nature, Lond (213) 256-260, 1967.
- Chambers TJ: The cellular basis of bone resorption. Clin Orthop (151) 283-293, 1980.
- Chickerur NS, Mahapatra PP: Behavior of hydroxylapatite and Vanadohydroxylapatite in aqueous media. Ind J Chem (16A) 672-672, 1978.
- Chiroff RT, White EW, Weber JN, Roy DM: Tissue ingrowth of Replamineform implants. J Biomed Mater Res Symp (6) 29-45, 1975.
- Clark AE, Hench LL, Paschall HA: The influence of surface chemistry on implant interface histology: a theoretical basis for implant material selection. J Biomed Mater Res (16) 161-174, 1976.
- Cochran GVB, Pawluk RJ, Bassett CAL: Stress generated electric potentials in the mandible and teeth. Arch Oral Biol (12) 917-920, 1967.
- Culp LA: Substrate-attached glycoproteins mediating adhesion of normal and virus-transformed cells. J Cell Biol (63) 71-83, 1974.
- Culp LA, Murray BA, Rollins BJ: Fibronectin and proteoglycans as determinants of cell-substratum adhesion. J Supramol Struct (11) 401-427, 1979.
- Curtis ASG: The mechanism of adhesion of cells to glass: a study by interference reflection microscopy. J Cell Biol (20) 199-215, 1964.
- Curtis ASG: Cell adhesion. Prog Biophys Mol Biol (28) 317-386, 1973.
- Dallemagne MJ, Richelle LJ: Inorganic chemistry of bone. In: Biological mineralisation. Zipkin I (Hrsg) SS. 23-42, Wiley u. Sons, N. Y. 1973.
- Davidovitch Z, Finkelton MD, Steigman S, Shaufeld JL, Montgomery PC, Korostoff E: Electric currents, bone remodelling and orthodontic tooth movements II. Am J Orthod (77) 33-47, 1980.
- Dempster DW, Elder HY, Smith DA: Scanning electron microscopy of rachitic rat bone. In: Scanning electron microscopy/1979/II O'Hare AMF (Hrsg) SS. 513-520 SEM Inc., Illinois 1979.
- Denissen HW: Dental root implants of apatite ceramics. Inaugural-Dissertation, Freie Univ. Amsterdam 1979.

- Denissen HW, de Groot K, Makkes PCh, van den Hooff A, Klopper JP:
Tissue response to dense apatite implants in rats. J Biomed Mater Res (14) 713-721, 1980 b.
- Denissen HW, van Dijk HJK, de Groot K, Klopper PJ, Vermeiden JPW, Gehring AP: Biological and mechanical evaluation of dense calcium hydroxyapatite made by continuous hot pressing. In: Mechanical properties of biomaterials, Hastings HW, Williams DF (Hrsg) SS. 489-505 Wiley u. Sons, Chichester 1980 a.
- Dessau W, Sasse J, Timpl R, Jilek F, von der Mark K: Synthesis and extracellular deposition of fibronectin in chondrocyte cultures. Response to the removal of extracellular cartilage matrix. J Cell Biol (79) 342-355, 1978.
- Dielert E: Korrosive Zerfallprodukte von Osteosynthese-Platten. Fortschr Med (100) 470, 1982.
- Dielert E: Nachweis der Korrosionsprodukte im Lagergewebe von Unterkieferresektionsplatten. Zahnärztl Praxis (34) 15-20, 1983
- Dielert E: Einfluß der sichtbaren biologischen Reaktion des Implantatlagers auf den quantitativen Anfall von Korrosionsprodukten. In: Fortschr Mund- Kiefer- Gesichtschir, Schuchardt K (Hrsg) SS. 49-54, Thieme, Stuttgart 1983 b.
- Dielert E, Fischer-Brandies E: Münchener Beobachtungen mit Hydroxylapatit. Zahnarzt (28) 43-47, 1984.
- Dielert E, Milachowski K, Schramel P: Die Bedeutung der legierungsspezifischen Eisen, Cobalt, Chrom und Nickel für die aseptische Lockerung von Hüftgelenkprothesen. Z Orthop (121) 58-63, 1983.
- Dielert E, Nentwig GH, Fischer-Brandies E, Bagambisa F: Experimentelle Untersuchungen zur biologischen Reaktion auf Hydroxylapatit-Keramik. Tagungsband des Deutschen Verbandes für Materialprüfung, Berlin, 1985.
- Dielert E, Schinko I, Hamm G: Zum Einsatz des Elektronenstrahls beim Identifizieren korrosiver Zerfallprodukte von Osteosyntheseplatten in biologischem Material. Dtsch. Z Mund- Kiefer- Gesichtschir (5) 159-178, 1981.
- Diewert V: Workshop report. In: Factors and mechanisms influencing bone growth. Dixon AD u. Sarnat BG (Hrsg) SS. 294-296. Liss Inc., N. Y. 1982.

- Dixon AD, Sarnat BG (Hrsg): Progress in clinical and biological research, Vol. 101: Factors and mechanisms influencing bone growth. Liss Inc., N. Y. 1982.
- Doi Y, Eanes ED: Transmission electron microscopic study of calcium phosphate formation in supersaturated solutions seeded with apatite. *Calcif Tissue Int* (36) 39-47, 1984.
- Doi Y, Eanes ED, Shinokawa H, Termine JD: Inhibition of seeded growth of enamel apatite crystals by amelogenin and enamel proteins in vitro. *J Dent Res* (63) 98-195, 1984.
- Driessens FCM: Mineral aspects of Dentistry. S. 24. Karger, Basel 1982.
- Driessens FCM: Formation and stability of calcium phosphates in relation to the phase composition of the mineral in calcified tissues. In: Bioceramics of calcium phosphate. de Groot K (Hrsg) SS. 1-32 CRC Press, Boca Raton 1983.
- Driskell TD, Hassler CR, McCoy LR: The significance of resorbable bioceramics in the repair of bone defects. *Proc 26th Ann Conf Eng Med Biol* (15) 199, 1973.
- Duff EJ, Grant AA: Apatite ceramics for use in implantation. In: Mechanical properties of biomaterials, Hastings GW u. Williams DF (Hrsg) SS. 465-475, Wiley u. Sons, Chichester 1980.
- Eanes ED, Gillesen IH, Posner AS: Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite. *Nature* (208) 365-367, 1965.
- Eanes ED, Harper RA, Gillesen IH, Posner AS: An amorphous component in bone mineral. In: 4th European Symp *Calcif Tissues* Gaillard PJ, van der Hoff A, Steendyk R (Hrsg) SS. 24-26, *Excerpta Med*, Amsterdam 1966.
- Egawa K, Suzuki I, Takiguchi R: Fine structure of osteocyte lacunar wall. *Bull Tokyo Dent Coll* (21) 127-135, 1980.
- Feenstra L, de Groot K: Medical use of calcium phosphate ceramics. In: Bioceramics of calcium phosphate, de Groot K (Hrsg) Kap. 7, CRC Press, Florida 1983.
- Fernandez-Moran H, Engström A: Electron microscopy and X-ray diffraction of bone. *Biochim Biophys Acta* (23) 260-264, 1957.
- Finn RA, Bell HW, Brammer JA: Interpositional "grafting" with autogenous bone and coralline hydroxyapatite. *J Maxillofac Surg* (8) 217-227, 1980.

- Fischer-Brandies E, Dielert E, Bagambisa F: Grenzschichtstrukturen Hydroxylapatit-Knochen beim Hund. Fortschr Zahnärztl Implantol (1) 224-227, 1985.
- Fischer-Brandies E, Dielert E: Das Verhalten von Kompakta und Periost bei subperiostaler Einlagerung von Hydroxylapatitimplantaten beim Hund. In: Biomaterialien und Nahtmaterialien, Rettig HM (Hrsg) SS.25-27, Springer, Berlin 1984
- Folkman J, Mascona A: Role of cell shape in growth control. Nature (273) 345-349, 1978.
- Frame JW, Browne RM, Brady CL: Hydroxyapatite as a bone substitute in jaws. Biomaterials (2) 19-22, 1981.
- Frenkel G, Niederdellman H: Anwendungsmöglichkeit dichter Aluminiumoxid-Keramik zur Rekonstruktion des Kiefergelenkes. Quintessenz Vol 28 Heft 11 Chirurgische Zahnheilkunde, Farbbildatlas 37-44, 1975.
- Frenkel G, Niederdellman H, Spitz PA: Zur Problematik des Kiefergelenkersatzes. Versuch einer Lösung durch eine totale Kiefergelenkendoprothese. In: Fortschr Kiefer- Gesichtschir. Bd XXI Schuchardt K (Hrsg) SS. 117-119, Thieme, Stuttgart 1976.
- Friedenberg ZB, Andrews ET, Smolenski BI, Pearl BW, Brighton CT: Bone reaction to varying amounts of direct current. Surg Gynecol Obstet (131) 894-899, 1970.
- Friedenstein AJ: Determined and inducible osteogenic precursor cells. In: Hard tissue growth, repair and remineralisation. Ciba Foundation Symposium 11. SS 169-181, Elsevier, N. Y. 1973.
- Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A, Frolova G: Heterotopic transplants of precursor cells for osteoblasts and haemopoietic tissues. Transplantation (6) 230-247, 1968.
- Frost HM: Skeletal physiology and bone remodeling. In: Fundamental and clinical bone physiology. Urist M (Hrsg) SS. 208-241, Lippincott, Philadelphia 1980.
- Fujimoto M, Egawa K, Ide Y, Takiguchi R: Scanning electron microscopy of calcifying cartilage matrix in the mandibular condyle. Bull Tokyo Dent Coll (12) 41-47, 1980.
- Gay CV: The ultrastructure of the extracellular phase of bone as observed in frozen thin sections. Calcif Tissue Res (23) 215-223, 1977.

- Glantz PO: On wettability and adhesiveness: A study of enamel, dentine, some restorative dental materials, and dental plaque. *Odontol Rev* (20) Suppl 17, 1-132, 1969.
- Glantz PO: The adhesiveness of teeth. *J Coll Interface Sci* (37) 281-290, 1971.
- Glimcher MJ: Molecular biology of mineralised tissues with particular reference to bone. *Rev Mod Phys* (31) 359-393, 1959.
- Glimcher MJ: Recent studies on the early mineral deposits in bone and enamel and of the organic matrix of enamel. In: *Proceedings Sixth European Symposium on calcified tissues*. Bauer G u. Dymling F (Hrsg) *Calcif Tissue Res* (2 Suppl A) 1, 1968.
- Glimcher MJ: Composition, structure and organisation of bone and other mineralised tissues and the mechanism of calcification. In: *Handbook of Physiology-Section 7 (Endocrinology Vol. VI)* Greep RO u. Astwood EB (Hrsg) SS. 25-116 Williams u. Wilkins, Washington 1976.
- Glimcher MJ, Bonar LC, Grynblas MD, Landis WJ, Roufosse AH: Recent studies of bone mineral: Is the amorphous calcium phosphate theory valid? *J Cryst Growth* (53) 100-119, 1981.
- Glowacki J, Kaban LB, Murray JE, Folkman J, Mulliken JB: Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects; *Lancet* (Vol. 1 Nr. 8227) 959-963 1981 a.
- Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB: Fate of mineralised and demineralised osseous implants in cranial defects. *Calcif Tissue Int* (33) 71-76, 1981 b.
- Gmelin: Pentacalciumhydroxidphosphat $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (Hydroxylapatit). In: *Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie* Nr. 28. Calcium Teil B, SS. 1142-1159. Chemie, Weinheim 1961.
- Göbel HE: Identifizierung kristalliner Phasen und Phasenkinetik von Festkörperreaktionen mit Hilfe der Pulver-Röntgendiffraktometrie. *Siemens Forschungs- und Entwicklungsberichte*, Juli 1985.
- Göthlin G, Ericsson JLE: The Osteoclast. *Clin Orthop* (120) 201-231, 1976.
- Gotoh T, Sugi Y, Hirakow R: Ultrastructural construction of collagen fibrils as revealed by the freeze-fracture technique. *J Electron Microsc* (32) 213-215, 1983.

- Graves GA, Hentrich RL, Stein HG, Bajpai PK: Resorbable ceramic implants. J Biomed Mater Res Symp (2) 91-115, 1971.
- Grinnell F: The serum dependence of baby hamster kidney cell attachment to a substratum. Exp Cell Res (97) 265-274, 1976.
- Grinnell F: Cellular adhesiveness and extracellular substrata. Int Rec Cytol (53) 65-144, 1978.
- Grinnell F, Feld MK: Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity. J Biomed Mater Res (15) 363-381, 1981.
- Grinnell F, Marshall JL: Coating bacterial dishes with fibronectin permits spreading and growth of human diploid fibroblasts. Cell Biol Int Rep (6) 1013-1018, 1982.
- Grinnell F, Milan N, Sreere PA: Attachment of normal and transformed hamster kidney cells to substrata varying in chemical composition. Biochem Med (7) 87-90, 1973.
- Grinnell F, Milan N, Sreere PA: Studies on cell adhesion II: Adhesion of cells to surfaces of diverse chemical composition and inhibition of adhesion by sulfhydryl binding reagents. Arch Biochem Biophys (153) 193-198, 1972.
- Grinnell F, Phan TV: Deposition of fibronectin on material surface exposed to plasma: Quantitative and biological studies. J Cell Physiol (116) 289-296, 1983.
- Griss P, von Andrien-Werbung H, Krempein B, Heimke G: Biological activity and histocompatibility of dense Al_2O_3 -MgO ceramic implants in rats. J Biomed Mater Res Symp (4) 453-462, 1973.
- Griss P, Heimke G, Werner E, Buchinger R, Jentschura G: Direct anchorage of ceramic joint prostheses. Present state and further experimental results. Biomed Mater Res Symp Trans (1) 8, 1977.
- Griss P, Krempein B, von Andrien-Werbung H, Heimke G, Fleiner R, Diehm T: Experimental analysis of ceramic interactions. A morphologic, fluoroscopic and radiographic study of dense aluminium oxide ceramic in various animals. J Biomed Mater Res Symp (5) 39-48, 1972.
- Griss P, Silber R, Merkle B, Haehner K, Heimke G, Krempein B: Biomechanically induced tissue reactions after Al_2O_3 -ceramic hip joint replacement. Experimental and early clinical results. J Biomed Mater Res Symp (7) 519-528, 1976.

- Griss P, Werner E, Heimke G: Alumina ceramic, bioglass and silicon nitride - A comparative biocompatibility study. In: Mechanical properties of biomaterials, Hastings HW u. Williams DF (Hrsg) SS. 217-226, Wiley u. Sons, N. Y. 1980.
- Gross U, Brandes J, Strunz V, Bab I, Sela J: The ultrastructure of the interface between a glass ceramic and bone. J Biomed Mater Res (15) 291-305, 1981.
- Grote JJ, Kuypers W, de Groot K: Use of sintered hydroxyapatite in middle ear surgery. J Otorhinolaryngol (43) 248-254, 1981.
- Grynblas MD, Bonar LC, Glimcher MJ: The failure to detect amorphous calcium phosphate (ACP) in bone mineral and the ACP theory of bone mineral. Calcif Tissue Int (35) Suppl A17, 1983.
- Grynblas MD, Bonar LC, Glimcher MJ: Failure to detect an amorphous calcium-phosphate solid phase in bone mineral: A radial distribution function study. Calcif Tissue Int (36) 291-301, 1984.
- Ham A, Gordon S: The origin of bone that forms in association with cancellous chips transplanted into muscle. Br J Plast Surg (5) 154-160, 1952.
- Ham AW, Harris WR: Repair and transplantation of bone. In: The biochemistry and physiology of bone, Bourne GH (Hrsg) Vol III SS. 337-399, Academic Press, N. Y. 1971.
- Harris B: The mechanical behaviour of composite materials. In: The mechanical properties of biological materials - 34 Symp Soc Experim Biol Vincent JFV u. Currey JD (Hrsg) SS. 37-74, Cambridge Univ Press, 1980.
- Hayek E: Die Mineralsubstanz der Knochen. Klin Wschr (45) 857-863, 1967.
- Hayek E, Newesely H: Pentacalcium monohydroxy-orthophosphate (Hydroxylapatite) Inorg Synth (7) 63-65, 1963.
- Hench LL, Ethridge EC: Biomaterials - The interfacial problem. Adv Biomed Eng (5) 35-150, 1975.
- Hench LL, Ethridge EC: In: Biophysics and Bioengineering Series, Noordergraaf (Hrsg) S. 63, Vol 4-Biomaterials: an interfacial approach. Academic Press, N. Y. 1982 a.
- Hench LL, Ethridge EC: 1982 b ibidem SS. 8 - 17.
- Hench LL, Ethridge EC: 1982 c ibidem SS. 279-288.
- Hench LL, Ethridge EC: 1982 d ibidem SS. 126-148.

- Hench LL, Paschall HA: Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscles. J Biomed Mater Res Symp (4) 25-42, 1973.
- Hench LL, Paschall HA: Histochemical responses at a biomaterials interface. J Biomed Mater Res Symp (5) 49-64, 1974.
- Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK: Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. J Biomed Mater Res Symp (2) 117-141, 1971.
- Hendricks SB, Jefferson ME, Mosley VM: The crystal structures of some natural and synthetic apatite-like substances. Z Krist (81) 352-369, 1932.
- Hennicke HW, Hofmann U, Lehnhäuser W, Leers KJ: Keramik. In: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie Bd 13 SS. 711-735, Chemie Weinheim 1977.
- Höhling HJ, Theman H, Vahl J: Collagen and apatite in hard tissues and pathological formations from a crystal chemical point of view. In: Third Symp Calcif Tissue. Fleisch H, Blackwood HJJ u. Owen M (Hrsg) SS. 146-151. Springer 1966.
- Hoppe F: Untersuchungen über die Constitution des Zahnschmelzes. Arch Path Anat Physiol (24) 13-32, 1862.
- Hoyte DAN: Directions and goals for bone growth research: The remodeling of bone and bones. In: Progress in clinical and biological research, Vol. 101. Dixon AD u. Sarnat BG (Hrsg) SS. 607-633, Liss Inc., N. Y. 1982.
- Hulbert SF, Cooks FW, Klawitter JJ, Leonard RB, Sauer BW, Moyle DD, Skinner HB: Attachment of prostheses to the musculoskeletal system by tissue ingrowth and mechanical interlocking. J Biomed Mater Res Symp (4) 1-23, 1973.
- Hulbert SF, King Jr FM, Klawitter JJ: Initial surface interactions of blood and blood components with Al_2O_3 and TiO_2 . J Biomed Mater Res Symp (2) 69-89, 1971.
- Hulbert SF, Morrison SJ, Klawitter JJ: Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures. J Biomed Mater Res (6) 347-374, 1972.
- Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH: Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. J Biomed Mater Res (4) 433-456, 1970.

- Hynes RO, Bye JM: Density and cell cycle dependence of cell surface proteins in hamster fibroblasts. *Cell* (3) 113-120, 1974.
- Hynes RO, Yamada KM: Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* (95) 369-377, 1982.
- Jarcho M: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* (157) 259-279, 1981.
- Jarcho M, Bolen CH, Thomas MB, Bobik J, Kay JF, Doremus RH: Hydroxylapatite synthesis and characterisation in dense polycrystalline form. *J Mater Sci* (11) 2027-2035, 1976.
- Jarcho M, Kay JF, Gumaer KI, Doremus RH, Drobeck HP: Tissue, cellular, and subcellular events at a bone-ceramic hydroxyapatite interface. *J Bioeng* (1) 79-92, 1977.
- Jarcho M, Salsbury RL, Thomas MB, Doremus RH: Synthesis and fabrication of β -tricalcium phosphate (whitlockite) ceramics for potential prosthetic applications. *J Mater Sci* (14) 142-150, 1979.
- Jobst B, Göbel HE: IDENT - A versatile microfile-based system for fast interactive X-ray powder diffraction phase analysis. *Adv X-ray Analysis* (25) 273-282, 1982
- Joint Committee on Powder Diffraction Standards (Hrsg). In: Powder diffraction file cards, 1601 Park Lane Swarthmore, Pa 19081 (USA), 1972.
- Jones SJ, Boyde A: Some morphological observations on osteoclasts. *Cell Tissue Res* (185) 387-397, 1977.
- Jong de WF: La substance minérale dans les os. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* (45) 445-448, 1926.
- Kaban LB, Glowacki J, Murray JE: Repair of experimental mandibular defects in rats. *Surg Forum* (30) 519-521, 1979.
- Kaban LB, Mulliken JB, Glowacki J: Treatment of jaw defects with demineralised bone implants. *J Oral Maxillofac Surg* (40) 623-626, 1982.
- Katz JL: Hard tissue as a composite material - I. Bounds on the elastic behavior. *J Biomech* (4) 455-473, 1971.
- Katz JL: The structure and biomechanics of bone. In: The mechanical properties of biological materials - 34th Symp Soc Exp Biol. Vincent JFV u. Currey JD (Hrsg) SS. 137-168, Cambridge Univ. Press, Cambridge 1980.

- Kawahara H, Yamagami A, Nakamura Jr M: Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* (18) 443-467, 1968.
- Kay JF, Doremus RH, Jarcho M: Ion micromicromilling of bone-implant interfaces. *Trans 4th Ann Meet Soc Biomater 10th Int Biomater Symp SS. 154-155, 1978.*
- Kerschbaum TH: Indikation und Häufigkeiten präprothetischer Eingriffe - Ergebnisse einer Umfrage. *Dtsch. Zahnärztl Z* (37) 82-87, 1982.
- Kieffer R, Benesovsky F: Pulvermetallurgie. In: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, Bd 19, SS. 563-576, Chemie, Weinheim 1980.
- Klawitter JJ, Hulbert SF: Application of porous ceramics for attachment of load bearing internal orthopaedic applications. *J Biomed Mater Res Symp* (2) 161-229, 1971.
- Knese KH: Stützgewebe und Skelettsystem. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bargmann W(Hrsg) Bd 2 Teil 5. SS 513-585, Springer, Berlin 1979
- Köster K, Karbe E, Kramer H, Heide H, König R: Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbare Calciumphosphat-Keramik. *Langenbecks Arch Chir* (341) 77-86, 1976.
- Krajewski A, Ravaglioli A: A physico-chemical study of crystal growth of hydroxyapatite bioceramic. *Biomaterials* (2) 105-111, 1981.
- Kramer IRH: The structure of bone and the process of bone repair. In: *Fractures of the facial skeleton*. Rowe NL u. Killey HC (Hrsg) SS. 615-625, E u. S. Livingston, Edinburgh 1970.
- Kuhlman RE: Functioning enzyme systems in skeletal tissue and their relationship to structure. In: *Fundamental and clinical bone physiology*, Urist MR (Hrsg) SS. 172-207, Lippincott, Philadelphia 1980.
- Laterra J, Ansbacher R, Culp LA: Glycosaminoglycans that bind cold-insoluble globulin in cell-substratum adhesion sites of murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* (77) 6662-6666, 1980.
- Lavine L, Lustrin S, Shamos MH, Rinaldi RA, Liboff AR: Electrical enhancement of bone healing. *Science* (175) 1118-1121, 1972.

- Leblond CP, Weinstock M: Radioangiographic studies of bone formation. In: The biochemistry and physiology of bone. Bourne GH (Hrsg) Bd III, SS. 181-200, Academic Press, N.Y. 1971.
- Lester S, Ash MM Jr: Ossification in adult rat mandibular condyle - SEM of chondroclasia. J Ultrastruct Res (74) 46-58, 1981.
- Levitt SR, Crayton PH, Monroe EA, Condrate RA: Forming methods for apatite prosthesis. J Biomed Mat Res (3) 683-684, 1969.
- Limborgh J van: Factors controlling skeletal morphogenesis. In: Factors and mechanisms influencing bone growth. Dixon AD u. Sarnat BG (Hrsg) SS 1-17, Liss Inc., N. Y. 1982.
- Luben RA, Sherman JK, Wadkins CL: Studies of the mechanism of biological calcification. IV. Ultrastructural analysis of calcifying tendon matrix. Calcif Tissue Res (11) 39-55, 1973.
- Maroudas NG: Growth of fibroblasts on linear and planar anchorages of limiting dimensions. Cell Res (81) 104-110, 1973.
- Maroudas NG: Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. J Theor Biol (49) 417-424, 1975.
- Matthews JL: Bone structure and ultrastructure. In: Fundamental and clinical bone physiology. Urist M (Hrsg) SS. 4-44 Lippincott, Philadelphia 1980.
- McConnell D: The crystal chemistry of carbonate apatites and their relationship to the composition of calcified tissues. J dent Res (31) 53-63, 1952.
- McConnell D: Human and vertebrate minerals. In: Encyclopedia of earth sciences, Vol IVB - The encyclopedia of mineralogy. Frye K (Hrsg) SS. 200-202, Hutchinson, Stroudsburg 1981 a.
- McConnell D: Apatite group. ibidem SS. 22-26, 1981 b.
- McConnell D, Forman DW Jr: Model for carbonate apatite. Inorg Chem (17) 2039-2040, 1978.
- Meier S, Drake C: SEM localisation of cell-surface associated fibronectin in the cranium of chick embryos utilising immunolabelled microspheres. J Embryol Exp Morphol (80) 175-195, 1984.
- Meyer JL, Eick JD, Nancollas GH, Johnson LN: A scanning electron microscope study of the growth of hydroxyapatite crystals. Calcif Tissue Res (10) 91-102, 1972.
- Miller AL, Schraer H: Ultrastructural observations of amorphous bone mineral in avian bone. Calcif Tissue Res (18) 311-324, 1975.

- Miller SC: Rapid activation of the medullary bone osteoclast cell surface by parathyroid hormone. *J Cell Biol* (76) 615-618, 1978.
- Mizutani H, Urist MR: The nature of bone morphogenetic protein (BMP) fractions derived from bovine bone matrix gelatin. *Clin Orthop* (171) 213-223, 1982.
- Mohan, S, Linkhart T, Fairley J, Baylink D: Bone derived factors active on bone cells. *Calcif Tissue Int* (36) S139-S149, 1984.
- Molnar Z: Development of the parietal bone of young mice. Crystals of bone in freeze-dried preparations. *J Ultrastruct Res* (3) 39-45, 1959.
- Momma WG: Erste Ergebnisse mit einem alloplastischen Kiefergelenkersatz einschließlich Pfanne. *Dtsch Zahnärztl Z* (32) 326, 1977.
- Momma WG: Kombinierte autoplastisch-alloplastische Rekonstruktion des Unterkiefers nach Hemimandibulectomie mit Exartikulation. *Fortsch Kiefer- Gesichtschir Bd XXIII. Schuchardt K* (Hrsg) SS. 141-143, Thieme, Stuttgart 1978.
- Morrison P, Edsall R, Miller SG: Preparation and properties of plasma and serum proteins. XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *J Am chem Soc* (70) 3103-3108, 1948.
- Mosesson MW, Umfleet RA: The cold-insoluble globulin of human plasma. I. Purification, primary characterization, and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components. *J Biol Chem* (245) 5728-5736, 1970.
- Münzberg KJ: Untersuchung zur Kristallographie der Knochenminerale. *Biom mineralisation* (1) 67-100, 1970.
- Mulliken JB, Glowacki J: Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial growth. *Plast Reconstr Surg* (65) 553-559, 1975.
- Mulliken JB, Glowacki J: Use of demineralised allogenic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. *Ann Surg* (194) 366-372, 1981.

- Nentwig GH, Glanville I: Hydroxylapatit und Aluminiumoxidkeramik mit und ohne Kollagenbeschichtung in der Zellkultur. In: Biomaterialien und Nahtmaterialien. Rettig HM (Hrsg) SS.28-32 Springer, Berlin 1984.
- Nery EB, Lynch KL, Hirthe WM, Mueller KH: Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects. J Periodontol (46) 328-346, 1975.
- Neuman WF: Bone material and calcification mechanisms. In: Fundamental and clinical bone physiology, Urist MR (Hrsg) SS. 83-107, Lippincott, Philadelphia 1980.
- Neuman WF, Neuman MW: The chemical dynamics of bone mineral. Chicago University Press, 1958.
- Neuman WF, Neuman MW, Diamond AG, Menanteau J, Gibbons WS: Blood: Bone Disequilibrium. IV. Studies of the solubility characteristics of brushite: Apatite mixtures and their stabilization by noncollagenous proteins of bone. Calcif Tissue Int (34) 149-157, 1982.
- Newesely H: Kristallchemische und micromorphologische Untersuchungen schwerlöslicher Calciumphosphate. Fortschr Chem Forsch (5) 688-746, 1966.
- Newesely H: High temperature behavior of hydroxy- and fluoroapatite: Crystal chemical implications of laser effects on dental enamel. J Oral Rehabil (4) 97-104, 1977.
- Newesely H, Osborn JF: Structural and textural implications of calcium phosphates in ceramics. In: Mechanical properties of biomaterials. Hastings GW, Williams DF (Hrsg) SS. 457-464, Wiley u. Sons, Chichester 1980.
- Nicole R: Metallschädigung bei Osteosynthesen. Schwabe, Basel 1947.
- Niederdehlmann H, Frenkel G, Dörre E: Anwendungsmöglichkeiten dichter Aluminiumoxidkeramik zu Rekonstruktionen im Kiefer- und Gesichtsbereich. Fortschr Kiefer- Gesichtschir Bd XXI Schuchardt K (Hrsg) SS. 51-53, Thieme, Stuttgart 1976.
- Okazi M, Moriwaki Y, Doi Y, Takahashi I, Aoba T: Basic phenomena in sintering of hydroxyapatites with high and low crystallinity. J Osaka Univ Dent Sch (20) 75-80, 1980.

- Osborn JF, Newesely H: The material science of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* (1) 108-111, 1980.
- Ostrowski K, Włodarski K: Induction of heterotopic bone formation. In: *The Biochemistry and Physiology of Bone*, Bourne GH (Hrsg) Bd III SS. 299-336 Academic Press, N. Y. 1971.
- Oudemans GT: *Proc Br Ceram Soc* (12) 83-98, 1969. Zitiert nach Klein Wassink 1971.
- Owen M: The origin of bone cells. *Int Rev Cytol* (28) 213-238, 1970.
- Owen M: Cellular dynamics of bone. In: *Biochemistry and Physiology of bone*, Bourne GH (Hrsg) Bd III SS. 271-298, Academic Press, N. Y. 1971.
- Owen M: Histogenesis of bone cells. (Editorial) *Calcif Tissue Res* (25) 205 - 207, 1978.
- Owen M: The origin of bone cells in the postnatal organism. *Arthr Rheum* (23) 1073-1080, 1980.
- Owen M: Bone growth at the cellular level: A perspective. In: *Factors and mechanisms influencing bone growth*. Dixon AD u. Sarnat BG (Hrsg) SS. 19-28, Liss Inc., N. Y. 1982.
- Pease DC: Bone growth at cellular level: Summary. In: *Factors and Mechanisms Influencing bone Growth*, Dixon AD u. Sarnat BG (Hrsg) SS. 160-162, Liss Inc., N. Y. 1982.
- Peck WA, Reddi AH, Gordon SL: Editorial. Local mechanisms that regulate bone formation: The subject of a recent NIH-Sponsored Workshop. *Calcif Tissue Int* (36) 1-3, 1984.
- Pedersen KN: Rebuilding of deficient edentulous alveolar ridge with porous ceramic implants. *Int J Oral Surg* (5) 133-141, 1976.
- Peelen JGJ, Rejda BV, de Groot K: Preparation and properties of sintered hydroxylapatite. *Ceram Intern* (4) 71-74, 1978.
- Peelen JGJ, Rejda BV, Vermeiden JPW, de Groot K: Sintered Tri-calcium phosphate as bioceramic. *Sci Ceram* (9) 226-236, 1977.
- Pennypacker JP, Hassell JR, Yamada KM, Pratt RM: The influence of an adhesive cell surface protein on chondrogenic expression in vitro. *Exp Cell Res* (121) 411-415, 1979.
- Perloff A, Posner AS: Crystalline basic calcium phosphate; *Inorg Synth* (6) 16-23, 1960.

- Petrovic A: Postnatal growth of bone: a perspective of current trends, new approaches and innovations. In: Factors and mechanisms influencing bone growth. Dixon AD u. Sarnat BG (Hrsg) SS. 297-331, Liss Inc., N. Y. 1982.
- Posner AS, Betts F, Blumenthal NC, McGann TCA, Kearny RD, Buchheim W: Amorphous calcium phosphate in biological systems: milk, micelles and mitochondria. Abstracts XVIII European Symposium on calcified tissues. Calcif Tissue Int (35, suppl) A 18, Abstr Nr. 67, 1983.
- Rabinovitch M, Destefano MJ: Manganese stimulates adhesion and spreading of mouse sarcoma I ascites cells. J Cell Biol (59) 165-176, 1973.
- Rahfoth B: Das Fibronektin als Marker für die Bindegewebsneubildung, speziell für die Morphogenese des Knorpels. Beitr Orthop Traumatol (31) 172-176, 1984.
- Rajaraman R, MacSween JM, Murdock CA: Exogenous fibronectin requirement for adhesion by neoplastic human cells. Exp Cell Biol (51) 9-18, 1983.
- Ralis ZA, Turner IG: Two phases of the bone mineral as revealed by the high resolution scanning electron microscope on ion-etched bone surfaces and as seen on surfaces untreated and chemically etched. Microsc Acta (84) 385-400, 1981.
- Rao WR, Boehm RF: A study of sintered apatites. J Dent Res (53) 1351-1354, 1974.
- Ray RD, Sabet TY: Bone grafts: Cellular survival versus induction. J Bone Joint Surg (45A) 337-344, 1963.
- Rhineland FW: Circulation in bone. In: Biochemistry and physiology of bone. Bourne GH (Hrsg) Bd II SS. 1-77 Academic Press, N. Y. 1972.
- Roberts WE, Goodwin WC, Heiner SR: Cellular response to orthodontic forces. Dent Clin North Am (25) 3-17, 1981.
- Robinson RA: Physicochemical structure of bone. Clin orthop (112) 263-315, 1975.
- Robinson RA, Doty SB, Cooper RR: Electron microscopy of mammalian bone. In: Biological Mineralisation, Zipkin I (Hrsg) SS. 257-296, Wiley u. Sons, N. Y. 1973.
- Robinson RA, Elliott S: The water content of bone: the mass of water, inorganic crystals, organic matrix and "CO₂ space"

- components in a unit volume of dog bone. J Bone Joint Surg (39A) 167-188, 1957.
- Robinson RA, Watson ML: Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope. I. Anat Rec (114) 383-410, 1952.
- Robinson RA, Watson ML: Crystal-collagen relationships in bone as observed in the electron microscope. III. Crystal and collagen morphology as a function of age. Ann N Y Acad Sci (60) 596-628, 1955.
- Rootare HM, Craig RG: Characterisation of hydroxyapatite powders and compacts at room temperature and after sintering at 1200°C. J Oral Rehab (5) 293-307, 1978.
- Rootare HM, Powers JM, Craig RG: Sintered hydroxyapatite ceramic for wear studies. J Dent Res (57) 777-783, 1978.
- Rosenberg MD: Microexudates from cells grown in tissue culture. Biophys J (1) 137-159, 1960.
- Roy DM, Linnehan SK: Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. Nature (247) 220-222, 1977.
- Ruoslahti E: Fibronectin in cell adhesion and invasion. Cancer Metast Rev (3) 43-51, 1984.
- Ryshkevitch E: Compressive strength of sintered alumina and zirconia. J Am Ceram Soc (36) 65-68, 1953.
- Salzer K, Holmes R, Johns D: Replamineform porous hydroxyapatite as bone substitute in craniofacial osseous reconstruction. J Dent Res (56B) 173 Abstr. 487, 1977.
- Schenck R, Willenegger H: Zur Histologie der primären Knochenheilung. Arch Klin Chir (308) 440-451, 1964.
- Schenck R, Willenegger H: Morphological findings in preliminary fracture healing. Symp Biol Hung (7) 75-86, 1967.
- Schläpfer F, Rahn BA, Suter K, Cordey J, Perren SM: Mechanical tests on microsamples of bone. In: Mechanical properties of biomaterials, Hastings GW u. Williams DF (Hrsg) SS. 357-365, Wiley u. Sons, Chichester 1980.
- Schmidt WJ: Das Wesen der Mandlschen Körperchen in den Teleosteerschuppen, ein Beitrag zum Verständnis der Kalkabscheidung bei der Bildung knochenartiger Gewebe. Z Naturforschung (2b) 233-238, 1947 a.

- Schmidt WJ: Über homogene und sphäritische Verkalkung bei den verschiedenen Arten des Knochengewebes. *Naturwiss* (34) 273-277, 1947 b.
- Schramel P, Klose BJ, Hasse S: Die Leistungsfähigkeit der ICP-Emissionsspektroskopie zur Bestimmung von Spurelementen in biologisch-medizinischen und im Umweltproben. *Fresenius Z Anal Chem* (310) 209-216, 1982.
- Seitz TL, Noonan KD, Hench LL, Noonan NE: Effect of fibronectin on the adhesion of an established cell line to a surface reactive biomaterial. *J Biomed Mater Res* (16) 195-207, 1982.
- Sela J: Bone remodeling in pathologic conditions. A scanning electron microscopic study. *Calcif Tissue Res* (23) 229-234, 1977.
- Sela J, Jaffe A: The role of Bone remodelling in the healing of extraction socket in rats. *Acta Anat* (97) 241-247, 1977.
- Shimabayashi S, Tamura C, Nagakaki M: Adsorption of mono- and divalent metal cations on hydroxyapatite in water. *Chem Pharm Bull* (29) 2116-2122, 1981.
- Shimabayashi S, Tamura C, Nagakaki M: Adsorption of hydroxyl ion on hydroxyapatite. *Chem Pharm Bull* (29) 3090-3098, 1981 a.
- Stoker M, O'Neill C, Berryman S, Waxman V: Anchorage and growth regulation in normal and virus transformed cells. *Int J Cancer* (3) 683-693, 1968.
- Strunz V, Gross UM, Männer K: Ergebnisse histologischer Untersuchungen an den Grenzflächen zwischen Knochengewebe und Glaskeramik (Ceravital) mit Apatitstruktur. In: Der heutige Stand der Implantologie. Ein Symposium. Franke J (Hrsg) SS. 49-75, Hanser, München 1980.
- Stutzmann J, Petrovic A: Origin, differentiation, nature and turnover of cells in human bone callus formed after fracture. *Calcif Tissue Int* (31) Abstr 129, 1980.
- Stutzmann J, Petrovic A: Bone cell histogenesis: The skeletoblast as a stem-cell for preosteoblasts and for secondary type prechondroblasts. In: Factors and mechanisms influencing bone growth. Dixon AD u. Sarnat BG (Hrsg) SS. 29-43, Liss Inc., N. Y. 1982.
- Swart JGN, Feenstra L, Ponssen H, de Groot K: (Übersetzung:) Preliminary clinical experiences with sintered hydroxylapatite as a substitute for bone. *Ned Tijdschr Geneeskd* (123) 1421-1424, 1979

- Swart JGN, de Groot K: Clinical experiences with sintered calcium phosphate as oral implant material. In: Dental Implants: materials and systems; papers presented at the symposium of the European Society for Biomaterials in "Theoret. Considerations and clin. applications of oral implants", Heidelberg, 1979, Heimke (Hrsg) Hanser, München 1980.
- Tagai H, Aoki H: Preparation of synthetic hydroxyapatite and sintering of apatite ceramics. In: Mechanical properties of biomaterials. Hastings HW u. Williams DF (Hrsg) SS. 477-488, Wiley u. Sons, Chichester 1980.
- Takiguchi R: Scanning electron microscopy of the bony palate of the rat. Bull Tokyo Dent Coll (20) 83-92, 1979.
- Takiguchi R: Scanning electron microscopic study of mandibular condyles of aged rats. Bull Tokyo Dent Coll (19) 149-158, 1978.
- Tatevossian A: Effect of parathyroid extract on blood calcium and osteoclast count in mice. Calcif Tissue Res (11) 251-257, 1973.
- Taylor AC: Attachment and spreading of cells in culture. Exp Cell Res Suppl (8) 154-173, 1961.
- Termine JD, Eanes ED: Comparative chemistry of apatitic calcium phosphate preparations. Calcif Tissue Res (10) 171-197, 1972.
- Termine JD, Eanes ED, Greenfield DJ, Nylen MU, Harper RA: Hydrozine deproteinized bone mineral. Calcif Tissue Res (12) 73-90, 1973.
- Termine JD, Posner AS: Amorphous/crystalline interrelationships in bone mineral. Calcif Tissue Res (1) 8-23, 1967.
- Thomson MB, Nancollas GH: Minerisation Kinetics: a constant composition approach. Science (200) 1059-1060, 1978.
- Tibone KW, Bernard GW: A new in vitro model of intramembranous osteogenesis from adult bone marrow stem cells. In: Factors and mechanisms influencing bone growth, Dixon AD u. Sarnat BG (Hrsg) SS. 197-123, Liss Inc., N. Y. 1982
- Triffitt JT: The organic matrix of bone tissue. In: The fundamental and clinical bone physiology, Urist MR (Hrsg) SS. 45-82, Lippincott, Philadelphia 1980.
- Tuinzing D, Swart JGN: Correction of mandibular asymmetry with

- porous calcium phosphate implants. J maxillofac Surg (19) 45-49, 1981.
- Turner IG, Jenkins GM: The spatial arrangement of bone mineral as revealed by ion bombardment. Biomaterials (2) 234-238, 1981.
- Urist MR: Bone: Formation by autoinduction. Science (150) 893-899, 1965.
- Urist MR: Biochemistry of calcification. In: The biochemistry and physiology of bone, Bourne GH (Hrsg) SS. 19-57, Academic Press, N. Y. 1976.
- Urist MR: Bone transplants and implants. In: Fundamental and clinical bone physiology. Urist MR (Hrsg) SS. 331-368, Lippincott, Philadelphia 1980.
- Urist MR, Iwata H: Preservation and biodegradation of the morphogenetic property of bone matrix. J Theoret Biol (38) 155-168, 1973.
- Urist MR, Mizutani H, Conover MA, Lietze A, Finerman GAM: Dentin, bone, and osteosarcoma tissue bone morphogenetic proteins. In: Factors and mechanisms influencing bone growth. Dixon AD u. Sarnat BG (Hrsg) SS. 61-81, Liss Inc., N. Y. 1982.
- Urist MR, Strates BS: Bone morphogenetic protein. J Dent Res (50 Suppl 6) 1392-1406, 1971.
- Walker DG: Osteopetrosis cured by temporary parabiosis. Science (180) 875, 1973.
- Walker DG: Spleen transmit osteopetrosis in mice. Science (190) 785-786, 1975.
- Walton AG: The formation and properties of precipitates. Interscience, N. Y. 1967.
- Klein Wassink RJ: Continuous hot pressing of reactive materials. High Temp High Press (3) 411-418, 1971.
- Watson ML, Robinson RA: Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope. II. Electron microscope study of basic calcium phosphate crystals. Am J Anat (93) 25-60, 1953.
- Weiss L: Studies on cellular adhesion in tissue culture. IV. The alteration of substrate by cell surfaces. Exp Cell Res (25) 504-517, 1961.
- Weiss L, Blumenson LE: Dynamic adhesion and separation of cells

- with hydrophilic and hydrophobic surfaces. *J Cell Phys* (70) 23-32, 1967.
- Weiss RE, Itatani C, Marshall GJ, Nimni ME: The role of fibronectin and substrate size in attachment of rat bone marrow cells to an osteoinductive matrix. In: *Scanning electron microscopy 1981 /IV O'Hare AMF (Hrsg) SS. 183-188, Illinois 1981.*
- Weiss RE, Reddi AH: Synthesis and localisation of fibronectin during collagenous matrix mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo. *Cell Biol* (77) 2974-2078, 1980a.
- Weiss RE, Reddi AH: Synthesis and localisation of fibronectin during collagenous matrix mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* (77) 2074-2078, 1980b.
- Weiss RE, Reddi AH: Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone and bone marrow. *J Cell Biol* (88) 630-636, 1981.
- Wezeman FH, Kuettner KE, Horton JE: Morphology of the osteoblast in resorbing fetal rat bone explants: effects of PTH and AIF in vitro. *Anat Rec* (194) 311-323, 1979.
- Williams G, Sallis JD: Structural factors influencing the ability of compounds to inhibit hydroxyapatite formation. *Calcif Tissue Int* (34) 169-177, 1982.
- Wolf H: Zur komplexen Wechselwirkung von Blut mit nichtbiologischen Oberflächen - Ein Überblick aus biophysikalischer Sicht. *Dtsch Gesundh.-Wesen* (36) 626-630, 717-720, 1981.
- Yamada KM: Immunological characterisation of a major transformation-sensitive fibroblast cell surface glycoprotein. Localisation, redistribution, and role in cell shape. *J Cell Biol* (78) 520-541, 1978.
- Yamada KM, Olden K: Fibronectins - adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature, London* (275) 179-184, 1978.
- Yamada KM, Weston JA: Isolation of a major cell surface glycoprotein from fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* (71) 2391-3496, 1974.
- Yasuda I: Mechanical and electrical Callus. *Ann NY Acad Sci* (238) 457-465, 1974.

- Yeomans JD, Urist MR: Bone induction by decalcified dentin implanted into oral osseous and muscle tissues. Arch Oral Biol (12) 999-1008, 1967.
- Zapf G, Dalal K: Sintereisen und Sinterstahl. In: Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie Bd 21, SS. 545-573, Chemie, Weinheim 1982.
- Zisman WA: Influence of constitution on adhesion. Ind Eng Chem (55) 19-38, 1963.
- Zisman WA: Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. In: Contact angles, wettability and adhesion. Gould RF (Hrsg) Adv Chem Ser no. 43, 1964.

Lebenslauf

- Am 23. Januar 1950 wurde ich in Buhara/Kabale (Uganda) als Sohn der Eheleute Yowasi und Grace Bigyere, geb. Keiremeeza, geboren.
- Januar 1960 - Besuch der Grundschule Muyebe Primary Integrated School
Dezember 1966
- Januar 1967 - Besuch des Gymnasiums Kigezi College,
Dezember 1970 Butobere
- Januar 1971 - "Advanced Level" am Kings College, Budo
Dezember 1972
- März 1973 Immatrikulation an der Makerere University,
Kampala (Naturwissenschaften)
22. November 1973 Beginn des Studienaufenthaltes in Jugoslawien
- Februar - Sprachkurs für Mazedonisch
Juni 1974
- September 1974 - Zahnmedizinstudium an der Stomatologischen
Juni 1979 Fakultät der Universität Kiril i Metodij,
Skopje/YU.
26. Juni 1979 Approbation als Zahnarzt
- Oktober 1979 - Zahnärztliche Tätigkeit am Medizinischen
März 1981 Zentrum in Probistip/YU.
- Mai 1981 Beginn des Aufenthaltes in der Bundesrepublik
Deutschland
16. Juli 1982 Bestehen der deutschen Sprachprüfung für ausländische Studienbewerber an der LMU München
28. Juli - Besuch des Lessing-Kolleg für Sprachen und
September 1982 Kultur, Marburg/Lahn
- Seit Dezember Doktorand an der Klinik und Poliklinik für
1982 Kieferchirurgie der Universität München aufgrund eines Stipendiums der Otto Benecke Stiftung
- Ab SS 1983 Immatrikulation an der LMU München für postgraduiertes Studium, zugleich Promotion

Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. D. Schlegel danke ich vielfmals für das große Interesse, das er beim Fortgang der Untersuchungen gezeigt hat sowie für die wohlwollende Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Dr. E. Dielert gilt für die Überlassung des Themas mein besonderer Dank. Er hat die Zusammenarbeit mit Instituten der Universität München und anderen Forschungseinrichtungen ermöglicht. Nur durch seine intensive tatkräftige Unterstützung bei den experimentellen Untersuchungen und bei der Auswertung von Ergebnissen konnte das umfangreiche Untersuchungsgut bewältigt werden. Seinen wissenschaftlichen Rat und seine Einsatzbereitschaft habe ich schätzen gelernt.

Herrn Dr. Dr. E. Fischer-Brandies danke ich für seine tatkräftige Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. Beim Fortgang der Arbeit habe ich jederzeit mit wissenschaftlichem Rat und wertvollen Anregungen von ihm rechnen dürfen.

Im Zuge der interdisziplinären Zusammenarbeit im Rahmen der Universität möchte ich mich besonders bedanken bei

Herrn Professor Dr. med. vet., Dr. med. C. Hammer (Institut für Chirurgische Forschung) für wissenschaftlichen Rat,

Herrn Professor Dr. med. Dr. med. h. c. W. Brendel für das Zurverfügungstellen der Institutseinrichtungen bei den tierexperimentellen Untersuchungen,

Frau Dipl.-Phys. I. Schinko (Anatomische Anstalt) für Hilfe bei der Rasterelektronenmikroskopie,

Frau W. Sommerfeld (Abteilung für Knochenmarksdiagnostik, Medizinische Klinik Innenstadt) für technische Hilfe bei der Herstellung von histologischen Präparaten.

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit Forschungseinrichtungen außerhalb der LMU München gilt mein Dank

Herrn Dipl.-Ing. Dr. A. Meyer (Forschungslaboratorien der Siemens AG, München) für das Zurverfügungstellen des Rasterelektronenmikroskops sowie für die Durchführung der Röntgen-Diffraktome-

metrischen Analyse,

Herrn R. Meier (Universität der Bundeswehr Neubiberg) für die Korrosionsversuche,

Herrn Dr. phil. P. Schramel (Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg) für spurenanalytische Untersuchungen.

Ohne finanzielle Unterstützung wäre das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Herr Professor Dr. Dr. E. Dielert wußte immer wieder Mittel zu beschaffen und achtete auf deren gezielten und sparsamen Einsatz.

Mein Lebensunterhalt im Laufe der Erstellung dieser Arbeit war nur möglich durch die finanzielle Förderung der Otto Benecke Stiftung, Bonner Talweg 57, Bonn. Wenn ich jetzt meinen ganz besonderen Dank an die Stiftung zum Ausdruck bringe, so geschieht dies in Anerkennung der gewährten Förderung. Ich hoffe, daß die Ergebnisse dieser Arbeit die lange Förderung rechtfertigen können.

